Untersuchungen zur Konstanz des Plastoms und über die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Plastiden von genetisch bekannten Oenotheren

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
JULIANE ALT
aus Laupheim

1980

Untersuchungen zur Konstanz des Plastoms und über die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Plastiden von genetisch bekannten Oenotheren

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
JULIANE ALT
aus Laupheim

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung 24. April 1980

Dekan Prof. Dr. W. Seyffert

1. Berichterstatter Prof. Dr. B. Schwemmle

2. Berichterstatter Prof. Dr. A. Hager

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle für die Anregung der Arbeit und seinen guten Rat - und nicht zuletzt für das Saatgut, das eine wesentliche Voraussetzung für meine Arbeit war.

Ebenfalls sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann (Lehrstuhl für Botanik der Universität Düsseldorf) und Herrn Dr. H.J. Bohnert für ihre freundliche Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der Bewältigung der Schwierigkeiten, die mir aus der biochemischen Ungunst meines Objektes erwachsen sind. Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann danke ich außerdem für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und seiner Mitarbeiterin Frau C. Bisanz für die cp-DNA aus der Oenothera hookeri.

Für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten danke ich Herrn Dr. P. Blanz, Frau E. Deml und Frau S. Dinkelmeyer (Institut für Spezielle Botanik der Universität Tübingen) und Herrn H. Schoppmann am Tübinger Lehrstuhl für Spezielle Zoologie.

Herr H. Friedrich (Lehrstuhl für Genetik der Universität Tübingen) hat mir großzügig Restriktionsendonuklease Bst I überlassen, und die Versuche mit Kpn I wurden mir durch Herrn Dr. H. Bießmann (MPI für Virusforschung in Tübingen) ermöglicht. Auch bei ihnen bedanke ich mich sehr.

Für seine freundliche Unterstützung durch anregende Gespräche danke ich Herrn Dr. G. Steinbrück (Institut für Zoologie der Universität Tübingen).

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau U. Christner, Herrn S. Lelke und Frau S. Görig, die mich so tatkräftig in Labor und Gewächshaus unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

arg	argentinae
ATP	Adenosintriphosphat
bert	berteriana
cp	Chloroplasten
Cpl.	Cytoplasma
cpm	counts (=gemessene Zerfälle) pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Δ E	Extinktion
e. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung (die Angaben des Schwerefeldes beziehen sich auf den Mittelpunkt des Zentrifugenröhrchens)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
hook	hookeri
Kb	Kilobasen
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt	Mitochondrien
Oe.	Oenothera
od	odorata
PAA	Polyacrylamid
Plstd.	Plastiden
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyl)oxazol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	5
II.A.	Material und Methoden zur Untersuchung der Chloroplasten-DNA	5
II.A.1.	Reagenzien und Pufferlösungen	5
II.A.2.	Versuchspflanzen	7
II.A.3.	Isolierung der Chloroplasten	8
II.A.4.	Isolierung der Chloroplasten-DNA	9
II.A.5.	Reinigung der Chloroplasten-DNA	9
II.A.6.	Elektronenmikroskopie	11
II.A.7.	Analytische Ultrazentrifugation	12
II.A.8.	Analyse mit Restriktionsenzymen	12
II.B.	Material und Methoden zur Untersuchung der RNA-Polymerase in Chloroplasten	13
II.B.1.	Reagenzien und Pufferlösungen	13
II.B.2.	Versuchspflanzen	16
II.B.3.	Isolierung der Chloroplasten	16
II.B.4.	Lyse der Chloroplasten und Präparation von Membranen	17
II.B.5.	Isolierung eines DNA-RNA-Polymerase-Komplexes	17
II.B.6.	Fraktionierung des gelösten 200 000xg-Pellets auf PAA-Gelen	18
II.B.7.	Bestimmung der Polymerase-Aktivität	20
II.B.8.	Synthese und Isolierung radioaktiver RNA aus cp und cp-Gesamtlysaten	21
II.B.9.	Isolierung von RNA aus e. coli	21
II.B.10.	Auftrennung der RNA auf PAA- bzw. Agarose-Gelen	22
II.B.11.	Auswertung der Gele	23
III.	ERGEBNISSE	24
III.A.	Untersuchung der cp-DNA	24
III.A.1.	Analytische Ultrazentrifugation	24
III.A.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchung der cp-DNA	26
III.A.3.	Restriktionsanalyse der cp-DNA	27
III.B.	Untersuchung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus cp	39
III.B.1.	Versuche zur Reinigung der RNA-Polymerase	39

Seite

III.B.2. Suche nach einem cp-eigenen, transcriptionsfähigem System 43

III.B.3. Charakterisierung der RNA-Polymerase-Aktivität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen 45

III.B.4. Charakterisierung der in vitro markierten RNAs 54

IV. DISKUSSION 59

V. ZUSAMMENFASSUNG 70

VI. ANHANG 72

VII. LITERATURVERZEICHNIS 76

I. EINLEITUNG

Seit Baur (1909) und Correns (1909) an Pelargonium bzw. Mirabilis eine wider die Mendelschen Regeln verlaufende, plasmagebundene Vererbung entdeckten, wurde auf verschiedene Weise versucht, deren Wesen aufzuklären:
Phäne wurden beschrieben, welche einer Steuerung durch das Plasma unterliegen, als Träger plasmatischer DNA Mitochondrien (z.B. Luck et al.,1964) und Chloroplasten (z.B. Chun et al., 1963; Sager und Ishida, 1963) entdeckt, und zur Transcription und Translation fähige in vitro-Systeme, welchen extrachromosomale DNA als Matritze diente, führten bereits zur Identifizierung einiger plasmacodierter Proteine (z.B. Bottomley et al., 1979).

Besonders bot sich das Studium von Unterschieden an reziproken Bastarden an. Schon recht bald erwiesen sich als besonders günstige Objekte dieser Forschungsrichtung Pflanzen der Gattung Oenothera: "die im Jahre 1925 erstmalig aufgezogenen Bastarde zwischen Oenothera berteriana[x)] und Oenothera odorata[x)]" zeigten "auffallend starke reziproke Unterschiede in Habitus, Blattfärbung und Blattgestalt, Röhrenlänge und Größe der Petalen" (J. Schwemmle, 1938).

Die Chromosomen eines haploiden Satzes werden bei diesen Oenotheren in der Reduktionsteilung gemeinsam (als Komplexe) verteilt. Die Chromosomenkomplexe der Oenothera berteriana sind mit B und 1, die der Oenothera odorata mit v und I benannt. Das Plasma der Zygote wird stets ausschließlich von der mütterlichen Pflanze gestellt. Daher ist es durch entsprechende Kreuzungen möglich, die Chromosomenkomplexe untereinander und diese jeweils mit berteriana- oder odorata-Plasma zu kombinieren. So stehen jetzt 14 Kreuzungstypen zur Verfügung, die reziproke Bastarde beinhalten. Die einmal gewonnenen Oenotherenformen können durch Selbstung als erbkonstante reine Linien bekannter genetischer Konstitution weiter gezogen werden (Cleland, 1972).

Morphologische Studien an Pflanzen, welche sich bei gleichem Genom im Plasma bzw. bei gleichem Plasma im Genom

---

x) Auf Grund der systematischen Bearbeitung der Gattung Oenothera (Onagraceae) von Dietrich (1977) ist die bisherige Oenothera berteriana als Oenothera villaricae und die bisher so genannte Oenothera odorata als Oenothera picensis sspec. picensis einzuordnen.

unterscheiden, lieferten also erste Anhaltspunkte, welche Merkmale vom Plasma mitbeeinflußt werden (J. Schwemmle und Mitarbeiter, 1938).

Diese Untersuchungen wurden bald auf physiologischem Gebiet erweitert und ergänzt. Es zeigte sich, daß vor allem lichtabhängige Reaktionen in Oenotheren durch extrachromosomale Faktoren mitgesteuert werden: so z.B. die circadiane Rhythmik (Frey, 1967; Frey und B. Schwemmle, 1967), die Samenkeimung und die Chlorophyllsynthese (Langewellpott, 1970), die phytochromgesteuerte Flavonoidsynthese (Christner, 1973), die CO_2-Fixierung (Haub, 1975) und das photoperiodische Blühverhalten (B. Schwemmle, 1962). In letzterem Fall gelang es sogar, zwischen dem Einfluß der Plastiden und dem des übrigen Plasmas zu differenzieren. - Frey (1964; Frey und B. Schwemmle, 1967) konnte einen Einfluß der extrachromosomalen Erbsubstanz auf die Hitzeresistenz nachweisen, Hachtel und B. Schwemmle (1972) auf die Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL).Hachtel (1977) untersuchte die Proteine von Chloroplastenmembranen aus Oenotheren mit verschieden kombiniertem Kern und Plasma, Benz (1979) fand bei reziproken Bastarden Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran.

All diese Versuche ergaben, daß verschiedenes Plasma, mit gleichem Genom kombiniert, zu verschiedenen Ausprägungen führt. Diese Unterschiede müssen, da sie ja erblich sind, ihre Entsprechung in der DNA der Mitochondrien und Plastiden finden. Bezüglich der Mitochondrien wird diese These durch die Ergebnisse von Brennicke (1979) gestützt: vergleichende Analyse von mt-DNA mit Restriktionsendonukleasen[x)] ermöglichte hier die Charakterisierung verschiedener Genome in berteriana- und odorata-Mitochondrien.

---

x) Restriktionsendonukleasen sind Nukleasen, welche DNA nur innerhalb einer bestimmten, sechs bis sieben Basen umfassenden Erkennungsregion zu schneiden vermögen. Sequenzunterschiede bei verschiedenen DNAs werden somit immer dann erfaßbar, wenn sie zu Änderungen in Anzahl oder Abstand der Erkennungsregionen für ein bestimmtes Restriktionsenzym führen.

Im ersten Teil der Arbeit soll nun die DNA in den Plastiden der Oenothera odorata und der Oenothera berteriana durch Restriktionsanalyse miteinander verglichen und die bisherigen Untersuchungen zur genetischen Konstitution der Plastiden in den einzelnen Kreuzungsformen auf der Ebene der DNA ergänzt werden.

Der zweite Teil der Arbeit ergab sich aus dem Wunsch, einen Angriffspunkt für die Erforschung des Zusammenspiels der genetischen Systeme in Kern und Plasma zu finden:

denn - wie schon an anderen Objekten gezeigt - ist es auch bei Oenothera vor allem die K o m b i n a t i o n von chromosomalen und plasmagebundenen Genen, welche den Charakter der Pflanze bestimmt. So sind z.B. bestimmte Kern-Plasma-Kombinationen nicht lebensfähig (vgl. J. Schwemmle et al., 1938). Daneben kommt eine Fülle von Hinweisen aus molekularbiologischen Arbeiten an anderen Objekten, welche engste Zusammenarbeit der verschiedenen genetischen Systeme innerhalb einer Zelle fordern: schon allein das Verhältnis der Anzahl von cp-Proteinen zur Komplexität der cp-DNA ist ein Grund; Ellis' Versuche (1975) mit verschiedenen selektiv wirksamen Antibiotika, Analyse der während der Plastidenergrünung entstehenden (z.B. Chelm et al., 1979) oder von in vitro Systemen (z.B. Bottomley und Whitfeld, 1979) synthetisierten Produkte halfen die genetische Herkunft mancher Chloroplastenproteine zu klären und zeigten, daß manchmal an der Codierung ein und desselben Proteins verschiedene genetische Systeme beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (z.B. Ellis, 1975) und der coupling factor I (Kwanuyen und Wildman, 1978). Zusammenarbeit aber erfordert Koordination. Diese könnte z.B. über den Austausch regulatorisch wirksamer Proteinfaktoren zwischen Kern und Plasma geschehen. Daß ein solcher Austausch tatsächlich stattfindet, dafür sprechen u.a. Arbeiten von Blamire et al. (1974), Ohad und Drews (1974), Hoober und Stegeman (1973) und Kidd und Bogorad (1979), - und Angriffspunkt für eine solche Regulation könnte z.B. das Enzym mit der Schlüsselstellung in der RNA- und somit auch der Proteinsynthese sein: Die D N A - a b h ä n g i g e R N A - P o l y m e r a s e[x)] in den Chloroplasten.

Eine chloroplasteneigene RNA-Polymerase wurde erstmals in Arbeiten von Kirk (1964), Spencer und Whitfeld (1967), Bottomley et al. (1971) und Polya und Jagendorf (1971) nachgewiesen. Hallick et al. (1976) und Schiemann (1978; Schiemann et al., 1977) gelang es, von Chloroplastenmembranen aus Euglena gracilis einen aktiven DNA-RNA-Polymerase-Komplex

---

x) Die systematische Bezeichnung für die DNA-abhängige RNA-Polymerase lautet "Nukleosidtriphosphat:RNA-Nukleotidyltransferase"(E.C.2.7.7.6.).

abzulösen. Erste Versuche von Smith und Bogorad (1974), das Enzym aus Mais-Chloroplasten zu reinigen und zu fraktionieren, zeigen, daß es sich um ein komplexes Protein aus zwei großen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 180 000 und 140 000 und mehreren kleineren Untereinheiten handelt.

Zusammenfassend geht aus den bisher veröffentlichten Arbeiten hervor, daß sich das Chloroplastenenzym hinsichtlich seiner Aktivitätsoptima und in der Hemmbarkeit durch verschiedene Transcriptionsinhibitoren deutlich von den Enzymen des Zellkerns unterscheidet, daß außerdem keine seiner bis jetzt identifizierten Untereinheiten der Untereinheit eines Kernenzyms gleicht (Kidd und Bogorad, 1979).

Dennoch ist insgesamt noch recht wenig über die plastidale RNA-Polymerase bekannt, und die Daten aus verschiedenen Arbeitsgruppen z.T. widersprüchlich. So war es unbedingt erforderlich, dieses Schlüsselenzym der Proteinsynthese in Oenotherenchloroplasten einerseits nach herkömmlichen Kriterien zu untersuchen, andrerseits ein transcriptionsfähiges in vitro System zu finden, als Voraussetzung zu künftigen vergleichenden Studien an diesem genau untersuchten genetischen System, welche eine Aufklärung der Regulation zwischen Kern und Plasma fördern könnten.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.A. Material und Methoden zur Untersuchung der Chloroplasten-DNA

II.A.1.1. Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Reagenzien verwendet:

Boehringer GmbH, Mannheim
- Restriktionsendonukleasen BamH I, EcoR I, Sma I
- Ribonuklease A
- Ethidiumbromid (EtBr)

Hormuth und Vetter, Wiesloch
- Whatman GF/C Glasfaserfilter

Marine Colloids Inc., Rockland, Maine,USA
- Seakem Agarose ME

Merck, Darmstadt
- Proteinase K
- Cäsiumchlorid Suprapur

New England Biolabs, Mass./USA
- Kpn I

Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N-Laurylsarkosin, Na-Salz (Sarkosyl)
- Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Das Restriktionsenzym Bst I wurde von Herrn H. Friedrich (Institut für Genetik, Universität Tübingen) präpariert, das Restriktionsenzym Sal V von Prof. R. Herrmann (Institut für Botanik,Universität Düsseldorf).

Außer den hier angeführten Präparaten wurden analysenreine Präparate der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

II.A.1.2. Pufferlösungen

Puffer A [x]
0,05 M Tris HCl, pH 7,6
0,33M Sorbit; 0,02 M NaCl; 0,5 mM KH_2PO_4;
1 mM $MgCl_2$; 1 mM $MnCl_2$; 7 mM EDTA;
5 mM 2-Mercaptoäthanol; 2 mM Natriumascorbat;
1,5 g/l PVP (löslich)

Puffer B
0,05 M Tris HCl, pH 7,6
0,3 M Saccharose; 1 mM EDTA

Saccharoselösungen für den Gradienten
65% (w/v) bzw. 25% (w/v) Saccharose in 0,05 M Tris HCl,
pH 7,6

Lyse-Mix
20 ml Sarkosyl; 50 ml 150 mM EDTA

TE-Puffer
0,01 M Tris HCl, pH 8
1 mM EDTA

Lösungen für Kleinschmidt-Spreitung
Hypophase: 0,25 M Ammoniumacetat, mit NH_3 auf pH 7,5 eingestellt
Hyperphase (Spreitlösung): 0,5 M Ammoniumacetat, pH 8
1 mM EDTA; mit konzentrierten Lösungen vor der Spreitung
auf 100 µg Cytochrom C/ml und 2-4 µg DNA/ml einstellen

SSC
0,15 M NaCl; 0,015 M Na-Citrat

1xTris-Ac
0,04 M Tris HCl; 0,02 M Natriumacetat; 0,02 M NaCl;
2 mM EDTA; mit HCOOH auf pH 8,15 einstellen

Stopmix
60% Saccharose; 0,1% SDS; 0,05% Bromphenolblau;0,1 M EDTA

---

[x] nach persönl. Mitteilung von Prof. R. Herrmann, Düsseldorf

II.A.2.1. Versuchspflanzen

Versuchsobjekte waren zwischen acht und vierzehn Wochen alte Oenotheren verschiedener genetischer Konstitution. Die Samen stammten aus Nachzuchten des Jahres 1972[x]. Maßgebend für den Zeitpunkt der Ernte war das Stadium, in dem erste Blütenknospen angesetzt wurden. Wann dieser Zustand erreicht war, hing von der Jahreszeit und der genetischen Konstitution der Pflanzen ab. Um bei der Chloroplastenisolierung störende Stärke, Phenole und Gerbstoffe abzubauen, wurden die Pflanzen die letzten drei Tage vor der Ernte verdunkelt. Beides - geeigneter Entwicklungszustand und Verdunkeln der Pflanzen - beeinflußte die DNA-Isolierung günstig.

Tabelle 1: Genetische Konstitution[xx] der untersuchten Oenotheren

Protokoll-Nr. (Bezeichnung)	Chromosomen-komplexe	Mitochondrien	Plastiden
1 (Oenothera bert.)	B.1	berteriana	berteriana
2	B.1	odorata	berteriana
3 (Oenothera od.)	v.I	odorata	odorata
4	v.I	odorata	berteriana
5	v.I	berteriana	odorata
6	v.I	berteriana	berteriana
8	B.I	berteriana	berteriana
9	B.I	odorata	odorata
10	l.I	berteriana	berteriana
11	l.v	berteriana	berteriana
12	l.v	odorata	odorata
13	B.v	berteriana	berteriana
14	B.v	odorata	odorata

[x] von Prof. B. Schwemmle, Botanisches Institut d. Univ. Tübingen

[xx] zur Herkunft der verschiedenen Formen s. J. Schwemmle (1938, 1941), B. Schwemmle (1962), Hagemann (1964)

II.A.2.2. Anzucht der Versuchspflanzen

Die Samen werden auf 2 Lagen Gelbband-Filterpapier in einer feuchten Kammer zum Keimen gebracht, die Keimlinge in Einheitserde (Typ T) pikiert und bei 20-22°C, 70% relativer Luftfeuchte und Licht-Dunkel-Wechsel gehalten (Licht: 4^{00}-20^{00}).

II.A.3. Isolierung der Chloroplasten

Die Blätter werden geerntet und zweimal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Der Stiel und der untere, breite Teil der Mittelrippe wird entfernt, da hier besonders viele bei der Chloroplastenisolierung störende Stoffe enthalten sind. Das weitere Vorgehen ist aus folgendem Flußdiagramm ersichtlich:

100 g Blätter in 1400 ml Puffer A
2 x 8 sec in Braun Multimixer
HOMOGENISIEREN
↓
Homogenat
FILTRIEREN:
1.) durch 2 Lagen Mull
2.) durch 4 Lagen Mull
3.) durch Nylongaze mit 10 µm Maschenweite
↓
Filtrat
ZENTRIFUGIEREN
(90 sec bei 4 000 x g)
↓
Sediment
mit 200 ml Puffer B
WASCHEN
↓
Sediment
in 20 ml Puffer B aufnehmen, auf 2 x 20 ml
65/25%igen (Stufen-)
SACCHAROSEGRADIENTen
schichten, 60 min bei 27 000 x g zentrifugieren
↓
grüne Haut aus
REINEn CHLOROPLASTEN
an der Grenzschicht zwischen den beiden
Saccharoselösungen mit Spatel entnehmen
und in gleichem Volumen Puffer B suspendieren.

Alle Arbeiten werden zwischen 0° und 4°C durchgeführt.

Abb.1: Flußdiagramm zur Isolierung von Chloroplasten

Diese Präparationstechnik liefert Chloroplasten, die im Phasenkontrastmikroskop zu etwa 85-90% glänzen und lichtmikroskopisch rein von fremden Partikeln sind. Wichtig beim Homogenisieren der Blätter ist das Verhältnis von Blattgewicht zum Volumen des Homogenisationsmediums und der Zusatz von PVP, um störende Gerbsäuren und Phenole zu verdünnen bzw. zu binden. Die EDTA-Konzentration im Extraktionspuffer ist so gewählt, daß die Kernmembran zerstört wird, die Chloroplastenmembran aber noch ganz bleibt, so daß die Chloroplasten bereits nach dem ersten Waschen im Wesentlichen rein von Kernen und deren Inhaltsstoffen sind.

II.A.4. Isolierung der DNA aus Chloroplasten

7 ml Chloroplastensuspension werden mit 1 ml Lysemix bei Zimmertemperatur lysiert (Endkonzentrationen: ca 3,5% Sarkosyl und 13 mM EDTA). Pro 8 ml Lysat, das jetzt ziemlich viskos ist, werden 8 g CsCl eingewogen, die Lösung in über Nacht eingeweichte, getrocknete Nitrozellulose-röhrchen gefüllt und mit 2 ml CsCl-Kissen (55 Gew.-% CsCl in TE) unterschichtet. In diesem Kissen wird die DNA bei 100 000 x g 14 h lang gesammelt und dadurch besonders schonend von den Membranbruchstücken abgetrennt [x].

Nach dem Zentrifugieren werden die Röhrchen unten angestochen und 0,5-ml-Fraktionen gesammelt. Zum Auffinden der DNA wird pro Fraktion 1 µl auf Whatman-Glasfaserfilter pipettiert und diese nach dem Trocknen der Tropfen etwa 2 min. in EtBr-Lösung (10 µg/ml) gefärbt. DNA-haltige Flecken fluoreszieren dann bei 364 nm.
Die DNA-haltigen Fraktionen werden vereinigt und über Nacht gegen 3 x 1 l TE dialysiert.

II.A.5. Reinigung der DNA

Zur Entfernung von RNA werden gegen Ende der Dialyse 100 µg RNase/ml einpipettiert und 1 h bei 4°C inkubiert. 10-minütiges Erhitzen der RNase vor der Inkubation auf 100°C zerstört evtl. vorhandene DNase-Aktivität.
Die in wenig TE gelöste Proteinase K wird 1 h bei 37°C vorinkubiert und dann mit der DNA zusammen 16-20 h weiterinkubiert (Endkonzentration: 200 µg Proteinase/ml Lösung).

---

[x] Mehtode nach persönl. Mitteilung Prof. R. Herrmann, Düsseldorf

Nach Zugabe von festem NaCl bis zu einer Konzentration von 3 % entfernt man Proteine durch Ausschütteln mit gleichem Volumen Phenol, das zuvor mit 3 % NaCl in TE äquilibriert worden war. Dabei wird nur vorsichtig von Hand geschüttelt, damit keine allzu großen Scherkräfte die DNA zerkleinern. Aus dem gleichen Grund wird nur mit weitlumigen Eppendorfhütchen aus Kunststoff pipettiert.

Restliches Phenol in der Lösung wird durch Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) entfernt.

Weitere Reinigung der DNA wird durch einen zweiten CsCl-Gradienten erzielt, der sich aus 7 ml DNA-Lösung, 8,6 g CsCl und 300 µg EtBr-Lösung (10 mg/ml) zusammensetzt. Während 48-60 h Zentrifugation bei 120 000 x g sammelt sich die DNA in der ihrer Dichte entsprechenden Zone und ist dann im UV-Licht (364 nm) als scharfe Bande sichtbar.

Die Lösung über der Bande wird vorsichtig abgesaugt und die Bande selbst mit einer Eppendorfpipette mit weitlumiger Spitze entnommen.

Zum Entfärben wird mehrmals mit TE-gesättigtem Isoamylalkohol ausgeschüttelt, zur Entfernung von CsCl über Nacht gegen 3 x 1 l TE dialysiert.

Die Gesamtmenge an DNA läßt sich über die Extinktion der CsCl-freien Lösung bei 260 nm berechnen: 20 O.D. entsprechen dabei einer DNA-Konzentration von 1 mg/ml.

Die DNA wird nun aus 0,3 M Naac mit doppeltem Volumen Äthanol über Nacht bei -20°C ausgefällt, das Sediment 30 min. bei 12 000 x g gesammelt, getrocknet und mit so viel TE aufgenommen, daß sich eine DNA-Konzentration von 150 µg/ml ergibt.

Die Ausbeute an DNA beträgt bis zu 100 µg DNA aus 100 g Blättern.

Eine Übersicht über die Reinigung der DNA gibt Abb.2.

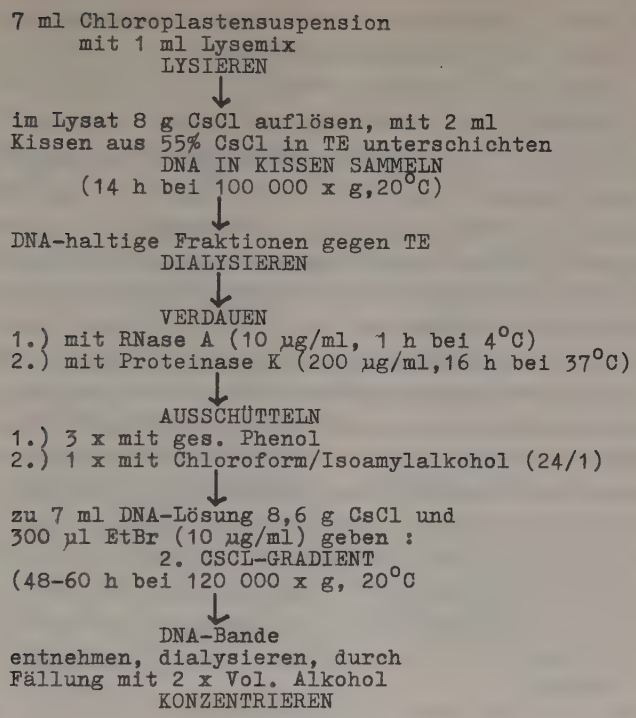


Abb. 2: Flußdiagramm zur Isolierung und Reinigung von DNA aus Chloroplasten

II.A.6. Elektronenmikroskopie

II.A.6.1. Befilmen der Netzchen

Als Objektträger für die Elektronenmikroskopie dienen 200-mesh-Kupfernetzchen, die zunächst auf folgende Weise befilmt werden:

Eine fettfreie Petrischale wird bis zum Rand mit aqua dest. gefüllt. Dann läßt man aus einer weitlumigen Pipette einen Tropfen 3,5% Parlodion (in 3,5% Amylacetat) auf die Wasseroberfläche gleiten. Nach kurzer Zeit polymerisiert die Lösung zu einem Film, der in der Mitte dick, an den Rändern dünn ist und der in verschiedenen Stärkebereichen verschiedene Interferenzfarben zeigt. Die goldenen und silbernen Bereiche werden mit den Kupfernetzchen belegt und Film samt Netzchen mit einem Rundfilter abgenommen, dessen Radius größer als der des Films ist.Nach dem Trocknen (über Nacht)

sind die Netzchen gebrauchsfertig (Royer, persönl. Mitteilung; Royer und Hollenberg, 1977).

II.A.6.2.Spreiten und Kontrastieren der DNA

Zur Spreitung der DNA nach der Methode von Kleinschmidt (1968) wird zunächst eine 90 mm Petrischale bis zum Rand mit Hypophase gefüllt und ein mit Chromschwefelsäure entfetteter Objektträger unter einem Winkel von 45° hineingestellt. Die Wasseroberfläche wird mit etwas Talkum bestäubt. Zum Spreiten läßt man nun 50 µl der unmittelbar vorher gemischten Hyperphase langsam und stetig von etwa 2 cm oberhalb des Wasserspiegels ablaufen. Der an der Grenzschicht zwischen Luft und Wasser entstehende Film aus denaturiertem Cytochrom verdrängt das Talkum und die DNA, die darin eingebettet ist, kann mit einem befilmten Netzchen abgetupft werden. Man dehydriert je 5 sec in 50% und 90% Äthanol und bedampft die Präparate zur Kontrastierung mit 3 cm Legierung 1003 (Pt,Pd,Au,Ag) unter einem Winkel von 12°. Zum Betrachten und Photographieren wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zeiss M 9 Elektronenmikroskop verwendet.

II.A.7. Analytische Ultrazentrifugation

Zur Dichte-Bestimmung der DNA in der analytischen Ultrazentrifuge werden 1,5 µg gereinigte Chloroplasten-DNA in 10 µl TE und 1µg DNA aus Micrococcus lysodeiktikus als Standard (ρ = 1,731 g/cm^3) mit 390 µl CsCl in 0,2 x SSC (ρ = 1,40) gemischt. Als Referenz dient eine Küvette, die nur CsCl in 0,2 x SSC (ρ=1,40) enthält. Zentrifugiert wird über Nacht bei 100 000 x g. Gleichzeitig wird die Absorption bei 254 nm durch den Gradienten gemessen und aufgezeichnet. Aus dem Graphen wird die Wanderungsstrecke der DNA im Gradienten ermittelt und daraus die Dichte berechnet (nach Schildkraut,1962).

II.A.8. Analyse mit Restriktionsenzymen

Ein Ansatz besteht in der Regel aus

14 µl DNA in TE (150 µg/ml)
13 µl aqua bidest.
3 µl 10 x konz. Puffer, je nach Enzym nach Angabe des Herstellers
3-5 units Enzym in 0,5-2 µl Volumen

Nach 3-4 h Inkubation bei 37°C wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert. Dadurch werden gleichzeitig die DNA-Segmente endgültig voneinander getrennt und einer Reassoziation vorgebeugt. Dem gleichen Zweck dient die Zugabe von 1/10 Volumen Stopmix zu jeder Probe vor dem Auftragen.

Zur Trennung der DNA-Stücke im 0,8%igen Agarose-Gelen werden 0,4 g Agarose in 45 ml aqua dest. gelöst und unter Rühren in einem abgedeckten Gefäß 5 min gekocht. Die heiße Lösung wird mit 10 x Tris-ac gepuffert und zwischen zwei Glasplatten mit 2-mm-Spacer und -Kamm ausgegossen. Wenn das Gel nach etwa 30 min fest ist, werden die DNA-Proben in die einzelnen Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird 15-20 min bei 20 mA gestartet und 3-4 h bei 45 mA fortgesetzt. Als Elektrodenpuffer dient 1 x Tris-ac.

Danach werden die Gele 30 min in EtBr-Lösung (3 µg/ml) gefärbt und mit aqua dest. entfärbt. Zum Photographieren legt man sie auf eine von unten mit 364-nm-Licht angestrahlte Glasplatte und belichtet durch ein Rotfilter mit einer Polaroid Land Kamera etwa 5 min.

Die Molekulargewichte der DNA-Banden lassen sich nun aus den relativen Wanderungsgeschwindigkeiten zu mitgelaufenen Markern (λ /Hind III und λ / EcoR I) bestimmen.

II.B. Material und Methoden zur Untersuchung der RNA-Polymerase in Chloroplasten

II.B.1.1. Reagenzien

Amersham Buchler, Braunschweig
(5-^{3}H) Uridin 5'-Triphosphat, Na-Salz
Uridin 5'-(^{32}P) Triphosphat, Triäthylammonium-Salz

Biorad
Markerproteine für die Gelelektrophorese, M= 200 000- 40 000

Boehringer, Mannheim
t-RNA aus Hefe

Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Azur I

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y. 14650
X-Omat R film, XR-5, 125/13 x 18 cm

Hormuth und Vetter, Wiesloch
Whatman 3 MM
Whatman GF/C

Paesel-KG, Frankfurt
Adenosin-5'-Triphosphat, Na-Salz

Pharmacia, Uppsala/ Schweden
Sepharose 4B

Roth, Karlsruhe
Ribonuklease Puriss. B

Schuchardt, München
Dodecylnatriumsulfat (SDS)
Acrylamid
N,N'-Methylendiacrylamid

Serva, Heidelberg
Triton X-100
Amidoschwarz 10 B
Aluminiumoxid Aloca A 305

Sigma Chemical company, St. Louis/ USA
Cytidin-5'-Triphosphat
Guanin-5'-Triphosphat
Uridin-5'-Triphosphat

II.B.1.2. Lösungen

Elutionspuffer
0,05 M Tris HCl, pH 7,6
0,04 M 2-Mercaptoäthanol, 4 mM EDTA, 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$,
25% Glycerin, 1% Triton X-100

Puffer P für Polymerase-Aktivitätstest (falls im Text nicht anders angegeben)
0,05 M Tris HCl, pH 7,5
0,01 M $MgCl_2$, 0,04 M $(NH_4)_2SO_4$

10 x konzentrierte Stammlösungen (in Puffer P)
3 mM ATP, 3 mM CTP, 3 mM GTP, 100 mM $MgCl_2$

Puffer S
0,05 M Tris HCl, pH 7,5
0,04 M Mercaptoäthanol; 0,01 M $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 M $MgCl_2$

Waschmedium für radioaktive Filter
2% TCA (Trichloressigsäure)
0,01 M Tetra-Natriumdiphosphat-10-Hydrat

Szintmix I
900 ml Toluol; 600 ml Äthylenglycolmonomethyläther;
8,82 g PPO; 180 mg POPOP

Szintmix II
4 g PPO; 100 mg POPOP pro 1 Toluol

Tris/SDS
0,1 M Tris HCl, pH 7,5; 1% SDS

Nährlösung zur Anzucht von e. coli
10 g Pepton; 6 g Fleischextrakt; 1,2 g NaCl pro 1 aqua dest.

Waschmedium für e. coli
0,01 M Tris HCl, pH 7,8
0,06 M NH_4Cl; 0,01 M Mgac; 6 mM 2-Mercaptoäthanol

Puffer zur RNA-Isolierung
80% TE mit 3% NaCl; 10% Sarkosyl; 10% 0,1 M EDTA

Elektrophoresepuffer zur RNA-Fraktionierung
0,04 M Tris; 0,02 M Na-ac; 2 mM EDTA;
Mit HCOOH auf pH 7,8 einstellen

Elektrophoresepuffer zur Proteinfraktionierung
0,05 M Tris/Glycin, pH 8,5
0,1% SDS; 5 mM 2-Mercaptoäthanol

Auftragspuffer
0,05 M Tris/Glycin, pH 8,5
1% SDS; 3% Harnstoff; 10% Saccharose; 5 mM 2-Mercaptoäthanol;
0,05% Bromphenolblau

Lösungen für Proteinbestimmung nach Heil und Zillig
a) Färbelösung: 0,5 g Amidoschwarz 10 B; 45 ml Methanol;
   45 ml aqua dest.; 10 ml Eisessig
b) Entfärbelösung: 475 ml Methanol; 475 ml aqua dest.;
   50 ml Eisessig
c) Auflösungsmittel: 80% Ameisensäure; 10% Eisessig; 10% TCA

Stammlösungen für Polyacrylamidgele zur Proteinfraktionierung

a) 36,6 g Tris, 48 ml 1N HCl, pH 8,9
0,23 ml TEMED
pro 100 ml Lösung in Elektrophoresepuffer

b) 30 g Acrylamid; 0,8 g Bis-Acrylamid pro 100 ml Lsg. in H_2O

c) 1,12 g Ammoniumpersulfat pro 100 ml Lösung in H_2O

d) 0,8 g SDS; 24 g Harnstoff pro 100 ml Lösung in H_2O

Coomassie-Blau-Färbung (Proteine)

Färbelösung: 0,1% Coomassie-Brilliant-Blau in 50% Methanol/ 7% Essigsäure

Entfärbelösung: 5% Methanol/ 7% Essigsäure

Azur I-Färbung (RNA)

0,25 g Azur I in 1 l 0,1 M Na-citrat/ 0,2M NaH_2PO_4, pH 4

II.B.2. Versuchspflanzen

Für die Versuche zur Charakterisierung der RNA-Polymerase wurden in der Regel 5-6 Wochen alte l.v-Pflanzen mit berteriana-Plasma verwendet. Höchste Enzymaktivität zeigten Präparationen aus Pflanzen, die ohne vorheriges Verdunkeln um die Mittagszeit geerntet worden waren. Für vergleichende Untersuchungen wurden l.v-Pflanzen mit odorata-Plasma herangezogen.
Die Kulturbedingungen waren im Übrigen wie unter II.A.2.2. angegeben.

II.B.3. Isolierung der Chloroplasten

Die Chloroplasten werden nach dem Flußdiagramm von Abb.1 isoliert, mit der Abwandlung, daß sie nach dem Saccharosegradienten noch einmal mit Puffer B gewaschen werden, um die anhaftende Saccharosemenge zu reduzieren. Dies erleichtert eine anschließende Lyse durch osmotischen Schock.
Nach dem Waschen werden sie - falls ganze Chloroplasten erwünscht sind - in gleichem Volumen Puffer B aufgenommen, sonst in gleichem Volumen Puffer S. Bei Versuchen, aus denen die für die Polymerase-Aktivität optimale NH_4^+ bzw. Mg^{2+}-Konzentration ermittelt werden soll, werden die Chloroplasten in Puffer S ohne die entsprechenden Komponenten suspendiert.

Lagerung der Chloroplasten bis zu 12 Monaten bei -70°C hat keinen nennenswerten Verlust an Polymerase-Aktivität zur Folge.

II.B.4. Lyse der Chloroplasten und Präparation von Membranen

Die Chloroplasten werden entweder durch osmotischen Schock oder durch Ultraschall aufgebrochen.

Lichtmikroskopische Kontrolle hat ergeben, daß die Chloroplasten nach dreimaliger Beschallung für je 10 sec (im Branson-Sonifier, Modell S 75, Stellung 4) vollständig aufgebrochen sind. Oft sind hier noch Vesikel sichtbar, die jedoch wesentlich kleiner als ganze Chloroplasten sind.

Um einer zu starken Erwärmung vorzubeugen, wird die Ultraschallbehandlung im Eisbad und mit 2-minütigen Pausen zwischen den einzelnen Schüben durchgeführt.

Zur Lyse durch osmotischen Schock werden die Chloroplasten nach dem letzten Waschen in Puffer S suspendiert. Wenn danach noch viele Chloroplasten ganz sind - was wahrscheinlich daran liegt, daß ihnen noch Saccharose aus dem Gradienten anhaftet,- kann dem durch erneutes Zentrifugieren und Aufnehmen des Sediments in Puffer S begegnet werden.

Aus den so gewonnenen Chloroplastenlysaten setzt sich beim Zentrifugieren (30 min bei 24 000 x g und 4°C) die Membranfraktion ab.

II.B.5. Isolierung eines DNA-RNA-Polymerase-Komplexes, modifiziert nach Hallick (1976)

Hallick (1976) war es gelungen, aus Euglena-gracilis-Chloroplasten einen transcriptionsaktiven Komplex aus DNA und RNA-Polymerase zu isolieren. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Übertragung seiner Methode auf Oenotheren-Chloroplasten.

Die besten Resultate werden erzielt, wenn die ganzen Chloroplasten nach der Reinigung in doppeltem Volumen hypotonischem Elutionspuffer (ohne Glycerin und ohne $(NH_4)_2SO_4$) aufgenommen werden. Nach dem Platzen der Chloroplasten (mikroskpische Kontrolle!) wird das Lysat auf 25% Glycerin eingestellt und die Membranfraktion, von der die Polymerase jetzt durch 1% Triton und 4 mM EDTA abgelöst sein soll, 30 min lang in der Zentrifuge bei 24 000 x g und 4°C sedimentiert.

Zum Überstand pipettiert man so viel 4 M $(NH_4)_2SO_4$, daß sich eine Endkonzentration von 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$ ergibt.

Dann wird der DNA-Enzym-Komplex über eine 24 h lang äquilibrierte Sepharose-4B-Säule mit den Maßen 2,5 x 70 cm von der Hauptmenge der Chloroplastenproteine abgetrennt. Das Auftragsvolumen betrug in der Regel 5-6 ml.

Fraktionen à 10 ml werden gesammelt, von diesen zur Identifizierung von Protein die Transmission bei 280 nm gemessen und über einen Schreiber dokumentiert. Die Fraktionen des ersten peaks (normalerweise Fraktion 14-16; vgl. Abb.13) werden 4 h bei 60 000 rpm und 4°C im Spinco-Rotor Typ 65 zentrifugiert.

Beim Lösen des daraus resultierenden zähen, farblosen Pellets[x] erwies es sich als hilfreich, es mehrmals durch eine Spritze mit enger Kanüle aufzusaugen und wieder herauszuspritzen.

Eine andere Einengungsmethode ist die, die Säulenfraktionen 14-16 in einen dünnen Dialyseschlauch (Durchmesser ca 1 cm) zu füllen und im Kühlraum bei 4°C mit Kaltluft anzublasen. Dabei verdunsten ca 2,5 ml pro Stunde. Diese Methode erspart das mühsame Lösen des Pellets.

II.B.6. Fraktionierung des gelösten Pellets auf Polyacrylamidgelen

Um die Proteine im gelösten Pellet zu charakterisieren, wird zunächst nach Heil und Zillig (1970) der Proteingehalt bestimmt.
Bei einem Proteingehalt von weniger als 4mg/ml werden die Proteine mit gleichem Volumen 10%iger TCA 20 min im Eisbad gefällt, 10 min bei 5 000 x g abzentrifugiert und das Sediment zweimal in Aceton gewaschen, getrocknet und in so viel Auftragspuffer gelöst, daß sich eine Proteinkonzentration von etwa 4 mg/ml ergibt.

Kochen der Proben für 2 min, unmittelbar vor dem Auftragen, dissoziiert metastabile Aggregate.

Zur Herstellung von verschieden prozentigen Polyacrylamidgelen werden die Stammlösungen a-d nach dem Schema von Tabelle 2 gemischt.

---

[x] ein solches Pellet sedimentiert nur aus den Fraktionen des ersten peaks.

Tabelle 2: Schema zum Ansetzen der Gele

Stammlösung	15%iges Gel	7,5%iges Gel	2,5%iges Gel
a	8 ml	4 ml	0,5 ml
b	16 ml	8 ml +12 ml Puffer	1 ml +7 ml Puffer
c	4 ml	4 ml	0,5 ml
d	4 ml	4 ml	0,5 ml

Alle Slabgele werden mit den Maßen 0,2 x 14 x 16 cm - entsprechend ca 40 ml Volumen - gegossen.
Je nach gewünschter Trennwirkung dient 15%iges, 7,5%iges oder ein aus beiden Komponenten zu gleichen Teilen zusammengesetztes Gel als Trenngel und in jedem Fall ca 1/5 des Gesamt-Volumens 2,5%iges Gel als Sammelgel.

Für Rundgele werden Glas-oder Plexiglasröhrchen mit den Maßen 6 x 100 mm, die unten mit Parafilm abgedichtet sind, bis 1 cm unterhalb des oberen Randes mit Trenngel gefüllt, dann weitere 7 mm mit Sammelgel. Um eine glatte Oberfläche zu erzielen, werden die Gele sofort nach dem Gießen mit etwas aqua dest. überschichtet.

Das Auftragsvolumen beträgt für Slabgele etwa 50 µl/Probe, für Rundgele 100-150 µl.

Die Elektrophorese wird bei 170 V (Slabgele) bzw. 4 mA pro Röhrchen (Rundgele) durchgeführt. Nach 4-5 h ist die Bromphenolblau-Bande nach unten gewandert.

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden werden die Gele in 0,1% Coomassie-Blau über Nacht gefärbt und mit 5% Methanol/ 7% Eisessig entfärbt.

Die Rundgele werden nach dem Färben bei 620 nm photometrisch vermessen und die Molekulargewichte der Banden aus der relativen Wanderungsgeschwindigkeit zu Markerproteinen bestimmt.

II.B.7. Bestimmung der RNA-Polymerase-Aktivität

In Proben, deren RNA-Polymerase-Aktivität gemessen werden soll, geschieht dies über den Einbau von ^{3}H-UMP in säurefällbares Material. Dazu wird folgender Versuchsansatz bereitet:
5 µl 3 mM ATP; 5 µl 3 mM CTP; 5 µl 3 mM GTP; 15 µl Puffer P; 20 µl auf Polymeraseaktivität zu testende Lösung; 1,25 µCi ^{3}H-UTP (lyophilisiert). Dies ergibt folgende Endkonzentrationen: jeweils 0,3 mM ATP,CTP,GTP, 10 mM $MgCl_2$, 40 mM $(NH_4)_2SO_4$, 12,5 µM UTP. Die Zutaten werden im Eisbad gemischt und die Testansätze anschließend 10 min bei 30°C inkubiert.
Danach werden pro Ansatz 2 x 20 µl auf gekennzeichnete Filterplättchen pipettiert und die Syntheseprodukte nach dem Trocknen 15 min im Eisbad mit 10% TCA gefällt.
Um nicht eingebaute Radioaktivität zu entfernen, werden die Filter erst 5 x je 10 min in Waschmedium gewaschen, dann 2 x in 96%igem Äthanol.
Nach dem letzten Waschen werden die Filter 20 min bei 80°C getrocknet, in Szintillationsgläschen verteilt und mit je 0,5 ml Tris/SDS überschichtet. Zum Herauslösen der radioaktiv markierten RNA aus den Filtern wird 1 h bei 60°C inkubiert. Dies verbessert bei ^{3}H-markierten Proben die Zählausbeute.
Die Proben werden in je 12 ml Szintmix I in einem Szintillationszähler vom Typ Betaszint BF/8F 5000 ausgezählt.

Als Vergleich dienten pro Versuchsserie zwei Nullproben, für welche die Komponenten in gleicher Zusammensetzung im Eisbad gemischt, aber sofort auf Filterplättchen pipettiert und gefällt wurden.
Kontrollversuche mit dem Transcriptionshemmer Actinomycin D (10 µg/ml) zeigten jedoch, daß auf diese Art unspezifisch Radioaktivität auf den Filtern festgehalten wird: nach 10 min Inkubation mit Actinomycin D war der Kontrollwert stets wesentlich niedriger als ohne Inkubation. Dies könnte daher kommen, daß sich radioaktives Material sofort an die Membranen anlagert und dann bei der TCA-Fällung hängen bleibt. Deshalb wurden immer dann, wenn der Kontrollwert besonders genau sein mußte (z. B. wenn nur mit schwacher Polymerase-Aktivität zu rechnen war), Proben als Vergleich herangezogen, die bei sonst gleicher Zusammensetzung und Inku-

bationsdauer 10 µg Actinomycin D/ml enthielten.

II.B.8. Synthese und Isolierung radioaktiver RNA aus Chloroplasten und Chloroplastenlysaten

Zur Synthese radioaktiver RNA werden je 20 µl 3 mM ATP,CTP und GTP mit 140 µl Chloroplastensuspension (ca 1 mg Protein/ ml) und 1,5-2 µCi α^{32}P-UTP oder 10 µCi ^{3}H-UTP inkubiert. Zugabe von 10 µl t-RNA (10 mg/ ml) zum Ansatz schützt die neu synthetisierte RNA vor endogenen RNasen (als Maßnahme gegen exogene RNasen werden alle Lösungen und Geräte vor Versuchsbeginn autoklaviert und Handschuhe zum Arbeiten benutzt).

Nach beendeter Inkubation werden die Ansätze im Eisbad gekühlt und - um die Menge eingebauter Radioaktivität zu bestimmen - Aliquote zum Auszählen auf Rundfilter pipettiert. Der Rest wird in 0,5 ml kaltem Isolierungspuffer [x] lysiert, die RNA durch dreimaliges Ausschütteln mit puffergesättigtem Phenol von Proteinen befreit und durch Ausfällen aus 0,3 M Na-ac mit doppeltem Volumen Alkohol angereichert.

Unmittelbar vor dem Weiterverarbeiten wird das Präzipitat aufgeschüttelt und - bei ^{32}P-Markierung - 10 000 cpm, bei ^{3}H-Markierung 30 000 cpm entnommen und 10 min in der Kälte sedimentiert. Das Pellet wird kurz getrocknet, in 20 µl Elektrophoresepuffer mit 6 M Harnstoff, 10% Saccharose und 0,05% Bromphenolblau gelöst und 10 min bei 65°C denaturiert.

II.B.9. Isolierung von RNA aus e. coli

Als Markermoleküle für die Gelelektrophorese in vitro synthetisierter Chloroplasten-RNA dient RNA verschiedener Größe aus dem RNase-freien Stamm MRE von e. coli. Dieses Objekt ist dazu bestens geeignet, mit geringem Aufwand eine hohe Ausbeute an 23s RNA, 16s RNA und 5s, 4,5s und 4s RNA zu erzielen.

Dazu werden 500 ml Bakterienkultur in der log-Phase (ca 8 h nach Überimpfung der Vorkultur in frisches Medium) 5 min bei 10 000 x g geerntet, 1 x mit Waschmedium gewaschen

---

[x] Sarkosyl und EDTA im Isolierungspuffer (wie unter II.B.1.2. angegeben) erhöhen die Ausbeute an RNA.

und das Pellet mit etwa doppeltem Volumen Aluminiumoxid bei 4°C zermörsert, bis eine zähe Paste entsteht. Diese wird mit dreifachem Volumen Waschmedium extrahiert und zum Sedimentieren von Alumina, ganzen Zellen und Zellbruchstücken 15 min bei 20 000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wird 30 min bei 4°C mit DNase (50 µg/ml) inkubiert, anschließend 30 min bei 37°C mit Proteinase K (200 µg/ml). Danach wird so viel festes NaCl eingewogen, daß sich eine NaCl-Konzentration von 3% ergibt. Die RNA wird daraus durch dreimaliges Ausschütteln mit puffergesättigtem Phenol und anschließendem Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) gereinigt, dann mit doppeltem Volumen Alkohol umgefällt und in wenig Auftragspuffer (wie unter II.B.8.) aufgenommen.

II.B.10. Auftrennung der RNA auf Polyacrylamid- bzw. Agarose-Gelen

Um Aufschluß über die Größe der in vitro synthetisierten RNA zu gewinnen, wurden zunächst Bedingungen gewählt, welche sich zur Trennung hochmolekularer ribosomaler Bakterien- bzw. Chloroplasten-RNA (16s und 23s) eignen:

a) 1%ige Agarose-Gele,
b) 2,4%ige Polyacrylamid-Gele ("PAA-Gele"), jeweils in 6 M Harnstoff.

Zum Ansetzen der Gele werden 18 g Harnstoff mit 5 ml 10 x konzentriertem Elektrophoresepuffer vermischt und mit aqua dest. auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt.
Für die Agarose-Gele werden 0,5 g Agarose in 50 ml dieses Puffers 5 min gekocht und dann entweder in 6 x 100 mm Plexiglasröhrchen, die unten mit Gummistopfen abgedichtet sind, - oder zwischen 14 x 16 cm-Plexiglasplatten mit 2 mm-Spacer gegossen.
Die Gele polymerisieren über Nacht bei 4°C.

Für 2,4%ige PAA-Gele werden 1,2 g Acrylamid und 0,04 g Bisacrylamid in 50 ml Puffer gelöst, 120 µl TEMED und 300 µl 18% Ammoniumpersulfat zugesetzt und wie oben in Röhrchen oder zwischen Platten gegossen.

Zum Aufbewahren werden die Gele mit Elektrophoresepuffer überschichtet und bei 4°C gelagert.

Zur Auftrennung der niedermolekularen RNA erwiesen sich 7,2%ige PAA-Gele als geeignet.

Dazu löst man 3,6 g Acrylamid und 0,04 g Bisacrylamid in 50 ml Puffer und gibt je 100 µl TEMED und 18% Ammoniumpersulfat hinzu.

Auf die so hergestellten Gele werden die Proben aufgetragen und folgendermaßen elektrophoretisch getrennt:
auf Rundgelen 20 min bei 1mA/Röhrchen, dann 3 h bei 2 mA/Röhrchen,
auf Slabgelen 20 min bei 40 V, dann 2,5-3 h bei 80 V.

II.B.11. Auswertung der Gele

II.B.11.1. Auffinden der Marker-RNA

Nach der Elektrophorese werden die Gele 30 min (Slabgele) bzw. 3 h (Rundgele) in Azur I angefärbt.und anschließend unter vorsichtigem Schütteln mit aqua dest. entfärbt.

Das Bandenmuster kann durch Vermessen und Aufzeichnen der Extinktion bei 260 nm in ungefärbten Gelen oder bei 620 nm in gefärbten Gelen dokumentiert werden.

II.B.11.2. Schneiden und Auszählen von Rundgelen

Zur Bestimmung der relativen Wanderungsgeschwindigkeit radioaktiv markierter RNA zur Marker-RNA werden die Rundgele zunächst mit einem Mickle-Gel-Slicer in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und diese in Szintillationsgläschen verteilt. Fraktionen, in denen die mit Azur I blau gefärbte Marker-RNA erscheint, werden gekennzeichnet.

Bei PAA-Gelen erleichtert vorheriges Einfrieren in CO_2 das Schneiden.

War die RNA mit ^{32}P markiert, so werden die Gelscheibchen bei 60°C getrocknet, mit je 4 ml Szintmix II überschichtet und ausgezählt.

Bei ^{3}H-markierten Proben läßt sich die Zählausbeute durch Herauslösen der RNA aus den Gelscheibchen verbessern: hierzu werden die Fraktionen mit je 0,4 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, und 20 µg RNase/ml 6 h bei 20°C inkubiert, dann mit je 5 µl 10% SDS kurz geschüttelt und mit je 12 ml Szintmix I vermessen.

Zum Vergleich der in vitro synthetisierten RNA mit der Marker-RNA wird die Radioaktivität in cpm gegen die Fraktionsnummer aufgezeichnet und die Lage der blau gefärbten Marker-Banden eingetragen.

II.B.11.3. Autoradiographie von Slabgelen

Slabgele werden nach dem Färben zunächst wie folgt zum Trocknen vorbereitet:
Auf eine beheizte Metallplatte wird eine Silikonmatte gelegt, darauf eine Lage Haushaltsfolie, dann das Gel, 1 Lage Whatman-3MM-Filterpapier, 3 Lagen dünnes Filterpapier und zuoberst eine 2. Silikonmatte mit Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe.

PAA-Gele werden 1,5 h bei 95°C, Agarose-Gele 2 h bei 70°C im Vakuum getrocknet.

Von dem trockenen Gel, das jetzt auf dem Filterpapier haftet, läßt sich die Haushaltsfolie leicht abziehen.

Zum Auffinden ^{32}P-markierter RNA wird in der Dunkelkammer ein Kodak X-Omat-Film mit einer Quanta Z-Verstärkerfolie aufgelegt und 12-24 h bei -20°C exponiert.

Bei Markierung der Gelecken mit radioaktiver Tinte vor dem Exponieren zeichnen sich diese auf dem Film ab, und die schwarzen RNA-Banden auf dem Film können leicht mit den blau gefärbten Marker-Banden auf dem Gel verglichen werden.

III. ERGEBNISSE

III.A. Untersuchung der Chloroplasten-DNA

Im Folgenden sollen nun zuerst die Ergebnisse aus den Versuchen zur Charakterisierung der DNA in den Oenotheren-Chloroplasten besprochen werden.

III.A.1. Analytische Ultrazentrifugation

Zunächst war es erforderlich, die gereinigte DNA als Chloroplasten-DNA zu identifizieren. Eine Möglichkeit hierfür ist die Bestimmung der Dichte in der analytischen Ultrazentrifuge.

Abb. 3 zeigt die Absorptionskurve einer über zwei präparative CsCl-Gradienten gereinigten cp-DNA aus Oenothera

berteriana mit DNA aus Micrococcus lysodeiktikus als Referenz. Der Hauptanteil (80-90%) der aus gereinigten Chloroplasten gewonnenen DNA bandierte bei einer Schwebedichte von 1,698 g/cm^3, entsprechend einem GC-Gehalt von 39% (berechnet nach Schildkraut, 1962). In dem Dichtebereich, in dem evtl. vorhandene Kern-DNA zu erwarten wäre, (nach Herrmann et al., 1975, bei 1,703 g/cm^3), zeigte sich nur eine kleine Schulter. Mitochondriale DNA mit einer Dichte von 1,710 g/cm^3 (Wert nach Brennicke, 1979)war nicht nachweisbar.

Eine entsprechende Untersuchung von cp-DNA aus Oenothera odorata lieferte das gleiche Bild.

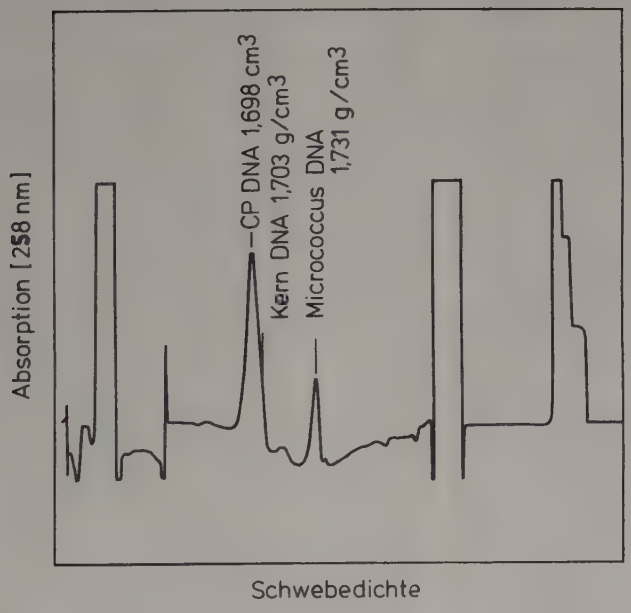


Abb.3: Bestimmung der Schwebedichte der cp-DNA aus Oenothera berteriana in der analytischen Ultrazentrifuge.

Etwa 10-20% der gesamten DNA hatten eine Schwebedichte von 1,703 g/cm^3, entsprechend der Dichte von Kern-DNA in Oenothera (Wert nach Herrmann et al., 1975). Der Hauptanteil war cp-DNA mit einer Dichte von 1,698 g/cm^3.

III.A.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung der cp-DNA

Zur weiteren Charakterisierung wurden verschiedene DNA-Präparationen im Elektronenmikroskop dargestellt.
Obwohl während der Isolierung der DNA darauf geachtet wurde, Scherkräfte zu vermeiden, wie sie z.B. durch zu heftiges Schütteln bzw. Rühren oder durch Adhäsion an Glaswände entstehen, konnten nur lineare Moleküle bis zu einer

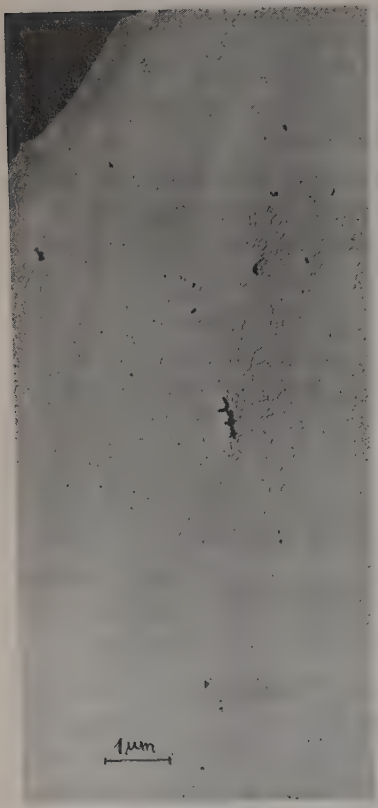


Abb.4a:
DNA aus osmotisch geschockten Chloroplasten, in ein CsCl-Kissen gesammelt.

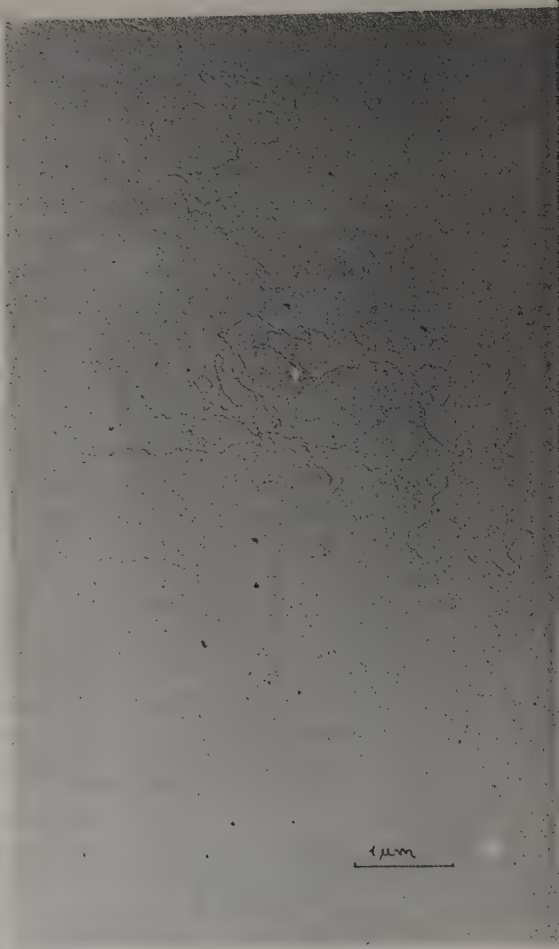


Abb.4b:
cp-DNA nach Behandlung mit Proteinase K und Phenol und anschließender Reinigung über einen zweiten CsCl-Gradienten.

Länge von etwa 40 µm elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Kleinere Stücke kamen statistisch verteilt in allen Größenklassen vor. In der Regel war die DNA umso länger, je weniger Reinigungsschritte unternommen wurden.

Abb.4a zeigt DNA, welche ohne weitere Reinigungsschritte aus osmotisch geschockten Chloroplasten in ein CsCl-Kissen zentrifugiert wurde. Die DNA scheint hochmolekular und teilweise zirkulär zu sein, ist jedoch auf Grund von anhaftenden Proteinpartikeln (evtl. Fragmente der inneren cp-Membran) nicht gleichmäßig verfolgbar.

Weitere Reinigung der DNA durch Proteinase-Verdau, Ausschütteln mit Phenol und Zentrifugieren in einem zweiten CsCl-Gradienten ergab elektronenmikroskopisch reine DNA (s. Abb.4b).

III.A.3. Restriktionsanalyse der Chloroplasten-DNA

Nach der Analyse der DNA im Dichtegradienten und im Elektronenmikroskop wurde DNA aus verschiedenen Chloroplasten mit Restriktionsendonukleasen auf Sequenzunterschiede untersucht. Hierzu wurde zunächst nach der beschriebenen Methode cp-DNA aus l.v-Pflanzen mit berteriana-Plasma mit folgenden Restriktionsenzymen geschnitten:
Sma I, Sal V, Kpn I, EcoR I und BamH I bzw. Bst I.
Alle genannten Enzyme haben eine Erkennungsregion von sechs Basen. Bst I erkennt die gleiche Basensequenz wie BamH I - liefert also das gleiche Spaltmuster -, arbeitet aber unter anderen Bedingungen.

Die cp-DNA ließ sich in jedem Fall problemlos von den Enzymen BamH Ibzw. Bst I, Sma I und Sal V schneiden. Kpn I dagegen kam aus ungeklärten Gründen in einigen DNA-Präparationen, die mit den anderen Enzymen verdaubar waren, nicht zur Wirkung. Eine mögliche Erklärung wäre die, daß dieses Enzym empfindlicher gegenüber Salzen ist, die bei der Fällung der DNA mit ausfallen, - oder gegenüber nicht identifizierten Fremdstoffen in der Präparation.

Bei Spaltung mit EcoR I erschienen oft Banden, die blasser waren, als es für ein Verdaumuster"typisch"[x] ist (s. Abb.5,

x)In einem Verdaumuster, in dem die einzelnen Banden in stöchiometrischem Verhältnis zueinander stehen, sollten die hochmolekularen Banden am stärksten fluoreszieren und die Fluoreszenz mit der Molekülgröße abnehmen.

hier ausnahmsweise bei Verdau mit BamH I).Diese Banden sind bei verschiedenen Verdauen der gleichen DNA-Präparation nicht reproduzierbar - also auch nicht spezifisch für eine bestimmte DNA. Mit Erhöhung der Enzymkonzentration und Verlängerung der Inkubationszeit nimmt die Häufigkeit solcher Banden ab. Die einfachste für dieses Phänomen wäre die, daß an einer bestimmten Spaltstelle im Molekül noch nicht alle Fragmente voneinander getrennt sind, daß der Verdau also unvollständig ist. Die blassen Banden wären dann keine echten Fragmente, sondern zwei, die noch nicht getrennt sind.

Dagegen fällt bei allen Restriktionsmustern auf - unabhängig davon, mit welchem Enzym geschnitten wurde -daß manche Banden wesentlich stärker fluoreszieren als erwartet. Hierbei handelt es sich entweder um Fragmente aus der Genregion für ribosomale RNA, die in jedem cp-DNA-Molekül zweifach vorhanden ist (Herrmann et al., 1976) oder um zwei monomolekulare Fragmente ähnlichen Molekulargewichts, die unter diesen Versuchsbedingungen nicht trennbar sind.

Einige Gelbilder zeigen die cp-DNA-Fragmente vor schwach und gleichmäßig gefärbten Hintergrund. Für dieses Phänomen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: entweder die reine cp-DNA ist aus irgendeinem Grund während der Präparation statistisch zerbrochen (z.B. durch zu große Scherkräfte, durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen) oder die cp-DNA ist mit Kern-DNA verunreinigt.

Denn: da die Erkennungssequenz eines Enzyms auf einem großen Molekül, wie z.B. Kern-DNA, bei weitem öfter vorkommt als auf einem kleinen, lassen sich dort die einzelnen Fragmente nicht mehr elektrophoretisch trennen und bilden nach dem Anfärben der Gele einen gleichmäßig gefärbten Hintergrund.

Nachdem die einzelnen Enzyme nun auf ihre Fähigkeit, gereinigte berteriana-cp-DNA zu schneiden, geprüft worden waren, wurde odorata-cp-DNA auf die gleiche Weise mit den genannten Enzymen verdaut und zum Vergleich neben berteriana-cp-DNA auf einem Gel aufgetrennt: Verdau mit Sma I zeigte identisches Bandenmuster bei beiden Plastomen[x)], Verdau mit Sal V nur Unterschied in einer Bande. Diese beiden Enzyme

---

[x)] Plastom: Gesamtheit der Chloroplasten-DNA

erwiesen sich also als untauglich, die gestellte Aufgabe zu erfüllen - nämlich die beiden verschiedenen Plastome gegeneinander abzugrenzen und deren Reinheit und Konstanz vor verschiedenem genetischen Hintergrund zu prüfen.

Als sehr gut geeignet zeigten sich dagegen die beiden Enzyme BamH I und Bst I. Sieben deutliche Unterschiede im Spaltmuster ermöglichen hier eine eindeutige Charakterisierung der beiden Molekülsorten. (s.Abb.5).

cp-DNA aus einer B.1-Pflanze, welche berteriana-Plastiden im fremden odorata-Cytoplasma enthält, zeigte das gleiche Spaltmuster wie cp-DNA aus der berteriana-Elternform.

Plastiden-DNA aus verschiedenen Oenotherenformen, welche alle die Chromosomenkomplexe v und I der Oenothera odorata haben, deren Plasma aber verschieden zusammengesetzt ist, wurde ebenfalls mit BamH I bzw. Bst I verdaut und die Fragmentmuster mit dem der cp-DNA aus der odorata-Elternform verglichen. Die Plastiden-DNA der Oenothera odorata mit berteriana-Cytoplasma und -Plastiden zeigte berteriana-Spaltmuster, die aus der Oenothera v.I mit odorata-Plastiden im berteriana-Cytoplasma odorata-Spaltmuster.(vgl. Abb.6).

Schließlich wurden die reziproken Bastardpaare mit den Chromosomenkomlexen B.I, 1.v und B.v, jeweils mit odorata-Plasma und berteriana-Plasma kombiniert, untersucht, außerdem die Oenothera 1.I mit berteriana-Plasma, deren Pendant mit odorata-Plasma nicht lebensfähig ist.

Abb. 7 zeigt die Restriktionsmuster der cp-DNAs aller Oenotheren-Bastarde mit berteriana-Plasma, Abb. 8 die der entsprechenden Formen mit odorata-Plasma - jeweils nach Behandlung mit BamH I oder Bst.

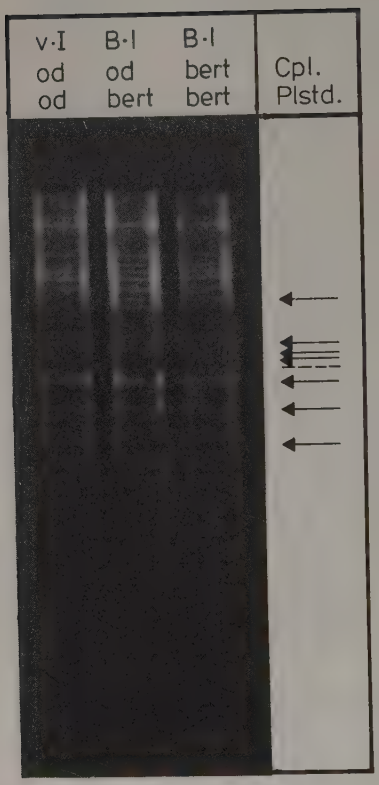


Abb.5: Restriktionsanalyse der cp-DNA aus den Elternformen Oenothera odorata (v.I) und Oenothera berteriana (B.1) und einer Oenothera berteriana (B.1), welche berteriana-Plastiden in Kombination mit odorata-Cytoplasma enthält, mit BamH I.

Die Fragmente, die aus der Behandlung der cp-DNA mit BamH I resultierten, wurden auf 0,8%igen Agarose-Gelen getrennt und nach Färbung mit EtBr photographiert.

Bei den Elternformen unterschiedliche Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die blasse Bande (gestrichelte Linie) ist nicht spezifisch für diese DNA, sondern sei hier als Beispiel für einen unvollständigen Verdau dargestellt (vgl.S.27).

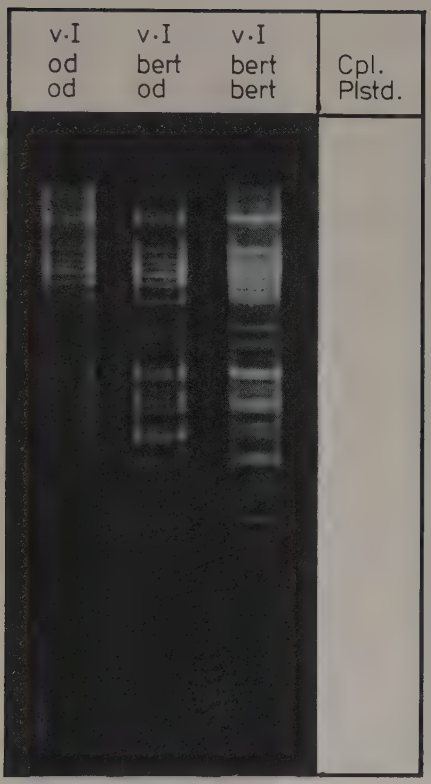


Abb.6: Vergleich der BamH I- bzw. Bst I[x)]-Restriktionsfragmente von cp-DNA aus Oenotheren-Formen, welchen die chromosomale Konstitution der Oenothera odorata (v.I) gemeinsam ist, die sich aber in der Zusammensetzung ihres Plasmas unterscheiden.

---

x) BamH I und Bst I sind Restriktionsenzyme, welche die gleiche Basensequenz erkennen - also das gleiche Bandenmuster liefern - aber unter verschiedenen Bedingungen aktiv sind.

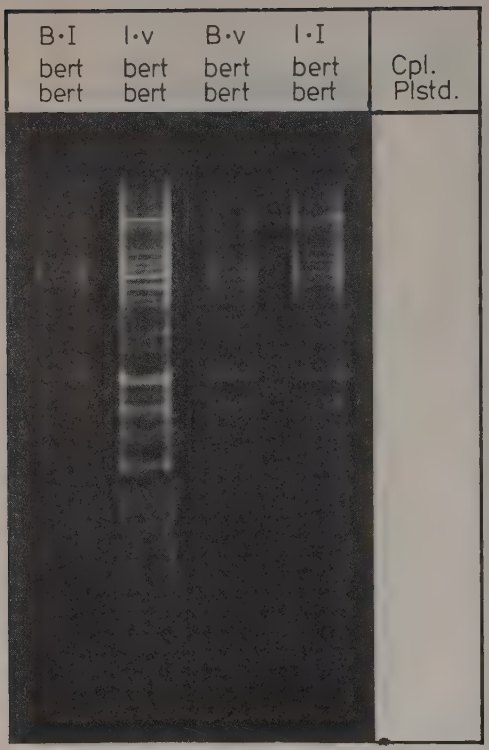


Abb.7:
Vergleich der BamH I/Bst I-Fragmente der cp-DNA aus Oenotherenformen, welche bei verschieden zusammengesetzten Chromosomenkomplexen aus beiden Elternformen alle berteriana-Plastiden enthalten.

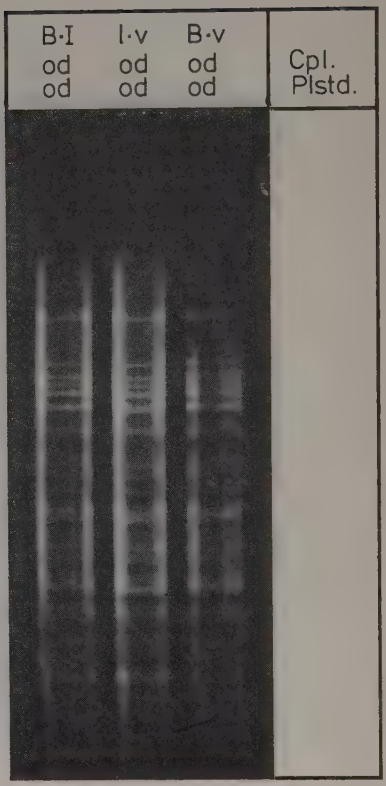


Abb.8:
Vergleich der entsprechenden Formen mit odorata-Plastiden.

Die Oenothera 1.I ist mit odorata Plastiden nicht lebensfähig.

Aus den Bildern ist ersichtlich, daß weder fremde Chromosomenkomplexe noch fremdes Cytoplasma einen Einfluß auf die genetische Konstitution der Plastiden hatten - zumindest nicht im Bereich der Erkennungsregion der Enzyme BamH I und Bst I.

Da es dennoch denkbar ist, daß sich einzelne Basen der cp-DNA zwischen den Schnittstellen für ein bestimmtes Enzym unter dem Einfluß fremder Genome verändert haben, wird die Aussage umso genauer, je mehr Enzyme mit verschiedenen Erkennungsregionen verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die geschilderten Befunde mit EcoR I und Kpn I nachgeprüft.

Auch hier lassen sich die verschiedenen Molekülsorten eindeutig gegeneinander abgrenzen: die Plastome der Oenothera odorata und der Oenothera berteriana unterscheiden sich bei Verdau mit EcoR I an vier, mit Kpn I an zwei Stellen.

Von den oben genanntenKreuzungsformen wurden mit EcoR I alle außer der Oenothera berteriana mit odorata-Cytoplasma, der Oenothera odorata mit berteriana-Cytoplasma und der l.I-Form analysiert, mit Kpn I alle außer der l.I.

Als Bespiele seien hier nur die Restriktionsmuster der cp-DNA aus den Elternformen (Abb. 9a und 10a) und aus je zwei Kreuzungsformen (Abb. 9b und 10b) dargestellt.

In allen Fällen unterstützten die Ergebnisse mit diesen beiden Enzymen die Aussage der BamH I/Bst I-Verdaue: die cp-DNA der verschiedenen Kreuzungsformen zeigte in allen Fällen unverändert das Bandenmuster der entsprechenden Elternform, unabhängig vom Cytoplasma und der Zusammensetzung des Genoms.

Als einzige Ausnahme zeigte die cp-DNA einer Oenothera odorata, die nach bisherigen Ergebnissen berteriana-Plastiden im odorata-Cytoplasma enthält, mit allen drei Restriktionsenzymen das Fragmentmuster der odorata-Plastiden (vgl. Abb.11).

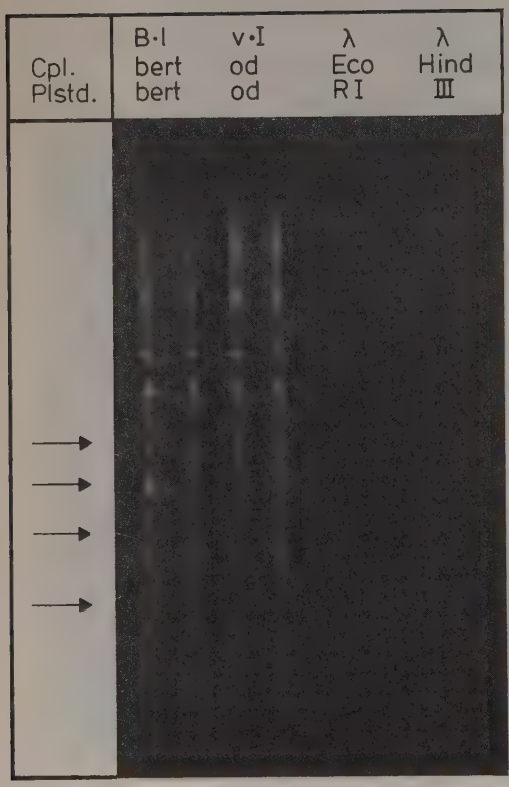


Abb.9a:
Vergleich der EcoR I-Fragmente der cp-DNA aus den Elternformen Oenothera berteriana (B.1) und Oenothera odorata (v.I).

Die Unterschiede sind durch Pfeile markiert.

Zum Vergleich sind hier die Hind III- und die EcoR I-Fragmente von λ -Phagen-DNA mit dargestellt, deren Größe bekannt ist.

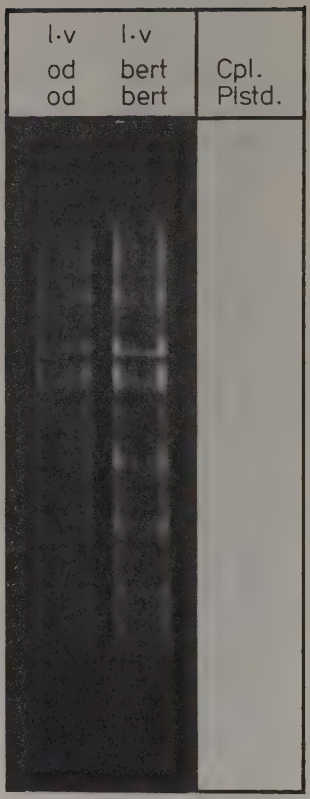


Abb.9b:
EcoR I-Fragmente der cp-DNA aus den beiden reziproken Bastarden mit den Chromosomenkomplexen 1 und v, einmal mit odorata-Plastiden, einmal mit berteriana-Plastiden.

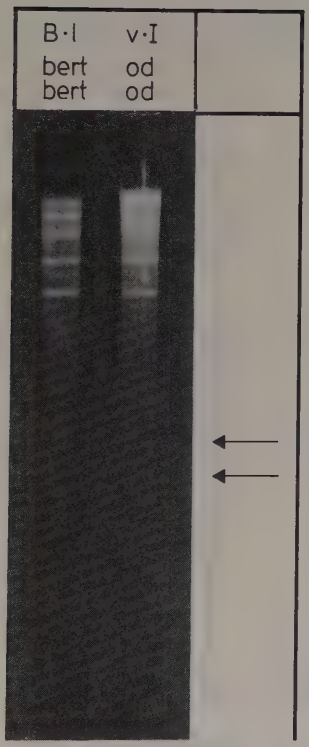


Abb.10a:
Restriktionsanalyse der cp-DNA aus den Elternformen Oenothera berteriana (B.1) und Oenothera odorata (v.I) mit Kpn I.

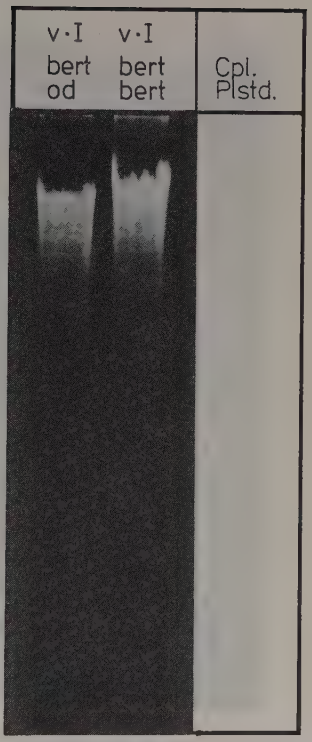


Abb.10b:
Kpn I-Restriktionsmuster einer Oenothera odorata (v.I) mit berteriana-Cytoplasma und -Plastiden und einer Oenothera odorata (v.I) mit odorata-Plastiden im berteriana-Cytoplasma

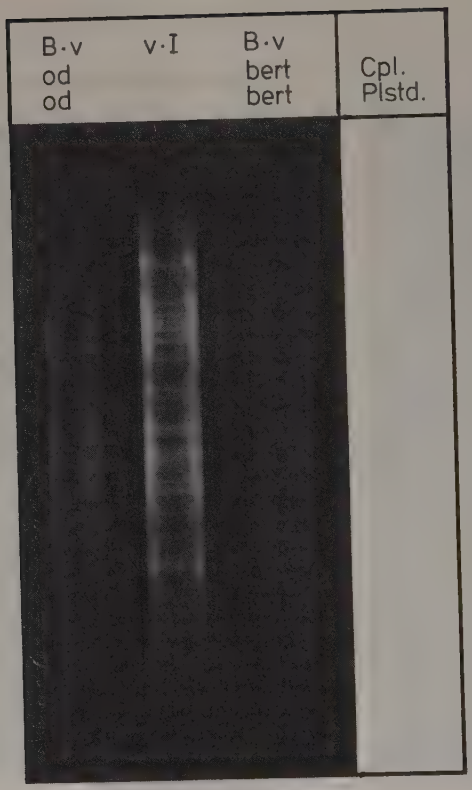


Abb.11: BamH I-Restriktionsmuster der cp-DNA einer Oenothera odorata (v.I; Mitte), die sich auf Grund bisheriger Ergebnisse wie eine v.I-Pflanze mit berteriana-Plastiden in odorata-Cytoplasma verhält, aber das Muster der odorata-cp-DNA zeigt. Zum Vergleich sind hier nochmals die BamH I-Muster des odorata- und des berteriana-Plastoms am Beispiel des reziproken Bastardpaares B.v dargestellt.

Als Ergänzung zu den elektronenmikroskopischen Längenmessungen wurde versucht, das Molekulargewicht der cp-DNA aus der Summe der Restriktionsfragmente zu bestimmen. Die Größe der BamH I/Bst I-, EcoR I- und Kpn-I-Fragmente wurde aus Eichkurven von im gleichen Gel mit-aufgetrennten Markermolekülen ermittelt. Markermoleküle waren die Hind III- und die EcoR I-Fragmente der DNA des Phagen λ. Ein Beispiel für ein Gel mit den λ -Fragmenten ist in Abb.9a wiedergegeben, ein Beispiel für eine Eichkurve in Abb. 12.

Eine Übersicht über die Fragmentgrößen der verdauten cp-DNA gibt Tabelle 3.

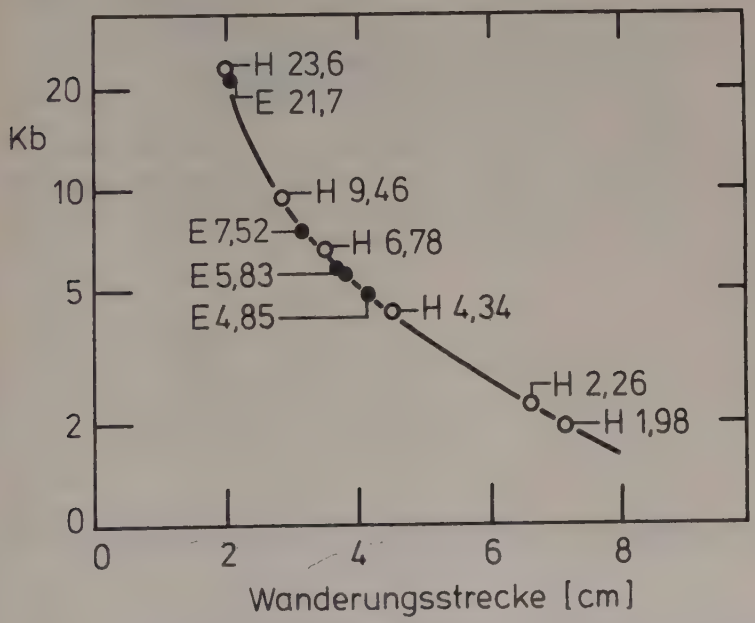


Abb.12: Beispiel für eine Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Restriktionsfragmenten der cp-DNA.

Auf jedem Gel wurden diese DNA-Fragmente bekannter Größe, die durch Behandlung von λ-Phagen-DNA mit EcoR I ("E"-Werte) bzw. Hind III ("H"-Werte) hervorgingen, mitelektrophoretisiert und die Wanderungsstrecke gegen das Molekulargewicht (in Kilobasen = Kb) aufgetragen.

Tabelle 3: Restriktionsfragmentlängen von c-DNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata.
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus vier (bei BamH I/ Bst I) bzw. drei verschiedenen Präparationen. In der Spalte Oe. od. sind nur die Fragmente aufgeführt, die sich von denen der Oe. bert. unterscheiden. Unterstrichene Zahlen gehören zu besonders stark fluoreszierenden Banden. Angegeben sind die Molekulargewichte in Kilobasen.

BamH I/ Bst I		Kpn I		EcoR I	
Oe. bert.	Oe. od.	Oe. bert.	Oe. od.	Oe. bert.	Oe. od.
12,1		28		17 x)	
7,9		21,7		13,5 x)	
7,2		17,5		7,5	
6,7		12,8		5	
6,3		10		4,1	
5,6		7,2		3,9	
5,2	-	6,2		3,8	
4,8		-	4,75	3,7	
3,85		4,6	-	3,4	
-	3,55	-	4,4	-	3,2
3,45	-	3,65	-	3	
-	3,4	-	3,55	-	2,8
-	2,9	3,4	-	2,6	
2,82	-	2,26		2,5	-
-	2,75	1,95		2,4	
2,64				2,3	
2,55				2,2	
2,44				2,15	
2,36				2	
2,21				1,9	-
2,06				1,85	
1,95				-	1,6
1,8				1,4	
1,72					
1,65					
1,6					
1,55					
1,4					
91,89	93,02	119,26	120,21	86,15	89,15

x) nicht immer nachweisbar (vgl. Text S.27)

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich einerseits mit der Reinigung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Oenotheren-Chloroplasten und mit der Identifizierung deren Untereinheiten, andrerseits mit der Charakterisierung dieses Enzyms nach herkömmlichen Kriterien.

III.B. Untersuchung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Chloroplasten von Oenothera

III.B.1. Versuche zur Reinigung der RNA-Polymerase

Zunächst wurde versucht, die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus den Chloroplasten der Oenothera l.v mit berteriana-Plasma nach der von Hallick (1976) an Euglena gracilis-Chloroplasten entwickelten Methode zu reinigen. Diese umfaßt folgende Schritte:

1.) Lyse der Chloroplasten
2.) Ablösung des membrangebundenen Enzyms durch Triton/EDTA-Behandlung
3.) Reinigung über eine Sepharose-Säule
4.) Konzentrieren der Säulenfraktionen

Ein Chloroplastenlysat, mit 1% Triton X-100 und 4 mM EDTA auf eine Sepharose-4B-Säule aufgetragen, lieferte das gleiche Elutionsprofil wie das von Hallick (1976) veröffentlichte:

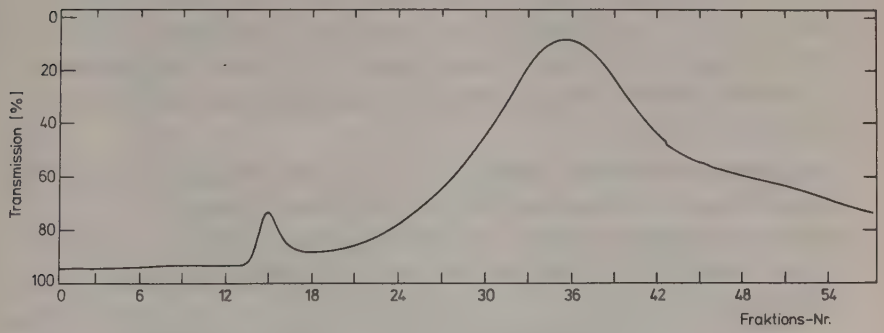


Abb.13: Elutionsprofil eines Triton/EDTA-bahandelten Chloroplastenlysats, auf eine Sepharose-4B-Säule aufgetragen; die Transmission wurde bei 280 nm gemessen, die Fraktionen hatten bei einer Zählzeit von 20 min ein Volumen von je 10 ml.

man bekam einen kleinen, chlorophyllfreien peak mit einem Maximum bei Fraktion 15 und einen großen, der den Hauptanteil der gelösten Chloroplastenproteine und Chlorophyll enthielt, mit einem Maximum bei Fraktion 36 (s. Abb.13).

In den unkonzentrierten Säulenfraktionen 13-16 lag die Proteinmenge stets etwa an der Nachweisgrenze der Methode von Heil und Zillig (1970; weniger als 10 µg/ml), während die Fraktionen im Maximum des Hauptpeaks etwa 800-1200 µg Protein/ml enthielten. Chlorophyll trat erst mit dem zweiten Ansteigen der Extinktion auf.

Vierstündiges Zentrifugieren bei 200 000 x g lieferte nur in den vereinigten Fraktionen 13-16 ein Pellet - nicht in den Fraktionen des Hauptpeaks. Dieses Pellet war sehr schlecht löslich. Nur nach mechanischer Zerkleinerung mit einer Spritze ließ es sich schließlich in 0,5-1 ml Puffer S aufnehmen. Der Proteingehalt betrug in den 1:60 bzw. 1:30 angereicherten Säulenfraktionen zwischen 100 und 400 µg/ml.

Sowohl das Elutionsprofil als auch das Sedimentieren der Säulenfraktionen des ersten peaks war in allen Fällen reproduzierbar.

Um die Proteine der Fraktionen 13-16 zu charakterisieren, wurde das gelöste 200 000 x g-Pellet auf verschieden konzentrierten Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe von Markermolekülen wurden dann die Molekulargewichte der einzelnen Banden bestimmt.

Die beste Auftrennung wurde dabei in 7,5%/15%igen Mischgelen mit einem Sammelgel von 2,5% erzielt. Zahl und Größe der Banden variierte von Präparation zu Präparation etwas, immer waren aber Banden mit folgenden Molekulargewichten vorhanden:

	a	220 000
	b	135 000
Schulter von	c	98 000
	c	94 000
	d	61 000
		(37 000)[x]
	e	10 000

[x] nur in zwei von sechs Präparationen nachweisbar

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus sechs verschiedenen Präparationen. -Jede Präparation wurde mindestens auf zwei verschiedenen Gelen (7,5%/15%-Mischgel und/oder 7,5% bzw. 15% PAA) aufgetrennt. Die Abweichung der angegebenen Molekulargewichte betrug für verschiedene Präparationen etwa ± 10%.

Abb.14 zeigt ein Beispiel für eine Eichkurve für ein 7,5%/15%-Mischgel, Abb.15 die photometrische Analyse eines Gels, auf dem die konzentrierten Säulenfraktionen 13-16 auf einem vergleichbaren Rundgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

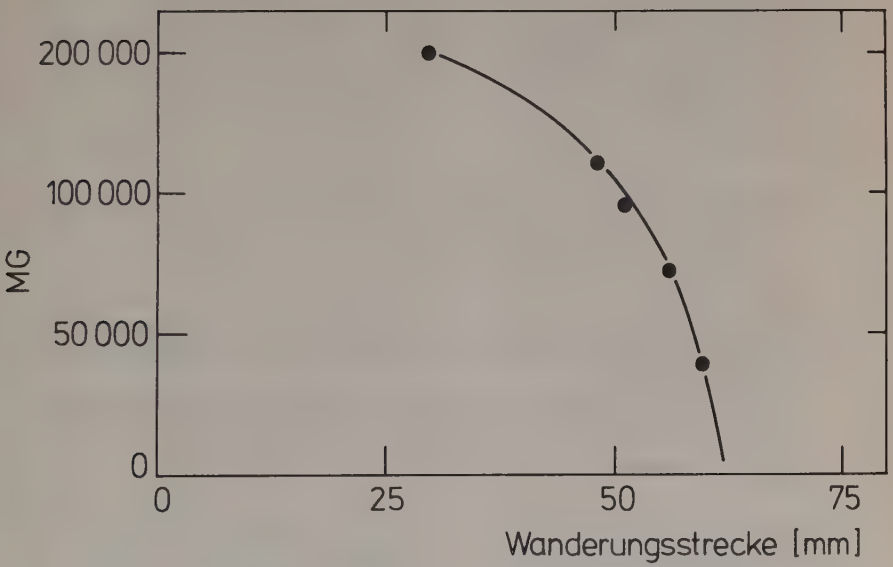


Abb.14: Wanderungsstrecken von Markerproteinen nach Elektrophorese in einem 7,5%/15%-Mischgel unter denaturierenden Bedingungen.

Markerproteine sind - dem Molekulargewicht (=MG) nach aufgeführt - Myosin (200 000), β-Galaktosidase (130 000), Phosphorylase B (94 000), BSA (68 000) und Ovalbumin (43 000).

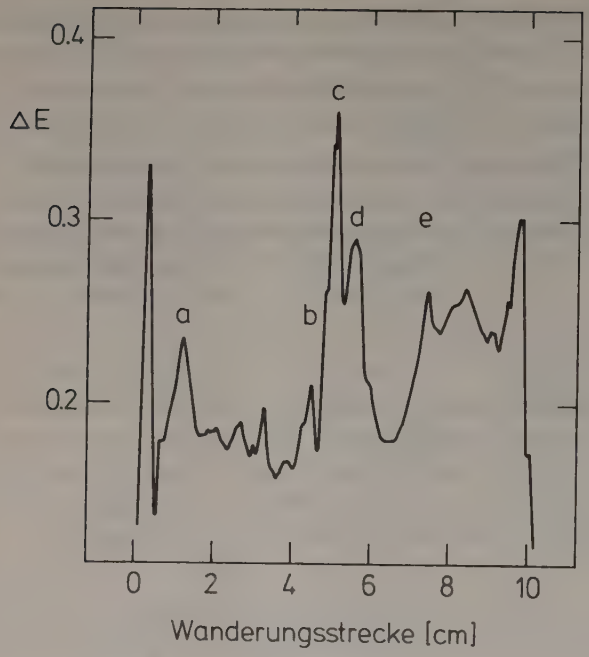


Abb.15: Auftrennung der konzentrierten Säulenfraktionen 13-16 auf einem 7,5%/15%-PAA(-Rund)-Gel unter denaturierenden Bedingungen.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie-Blau gefärbt und bei 620 nm gescannt.

Die peaks a-d werden im Text erläutert.

Inwieweit es sich allerdings bei den angegebenen Polypeptiden um echte Untereinheiten der Chloroplasten-Polymerase handelt, kann nicht eindeutig entschieden werden, zumal weder die einzelnen Säulenfraktionen noch das 200 000 x g-Pellet Polymerase-Aktivität aufwiesen. Was jedoch auffällt, ist die Ähnlichkeit des Elutionsprofils der Sepharose-Säule mit dem von Hallick (1976), der in den Fraktionen des kleinen peaks eine Anreicherung der Polymeraseaktivität nachwies, und die Übereinstimmung der Molekulargewichte der Polypeptide aus den konzentrierten Säulenfraktionen mit denen der von Smith und Bogorad (1974) gefundenen Untereinheiten der RNA-Polymerase aus Maischloroplasten.

Da das gereinigte Enzym nicht mehr aktiv war, mußte nach einem anderen System gesucht werden, um Daten über die chloroplasteneigene RNA-Polymerase zu sammeln.

III.B.2. Suche nach einem chloroplasteneigenen, transcriptionsfähigen System

III.B.2.1. Inkubation mit ganzen Chloroplasten und Chloroplasten-Gesamtlysaten

Zunächst wurden ganze, gereinigte berteriana-Chloroplasten durch Einbau von ^{3}H-markiertem UMP in säurefällbares Material auf Polymerase-Aktivität untersucht.

Dabei lieferte ein 40 µl-Ansatz nach 10 min Inkubation unter Standardbedingungen (s.II.B.7.) eine durchschnittliche Einbaurate von etwa 3 000-9 000 cpm - das entspricht einem Einbau von etwa 200-450 pMol UMP/mg Protein, oder - nach der Definition von Hallick (1976) [x] 0,2-0,45 Units/mg Protein.

Die Polymerase-Aktivität war jedoch in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten (nach Saccharose-Gradient in hypotonischem Puffer S aufgenommen) stets etwa um ein Drittel höher.Dies ist leicht verständlich, da nach Hartley (1973) eine physiologisch intakte Chloroplastenmembran für Nukleosidtriphosphate undurchlässig ist. Daß hier dennoch UMP eingebaut wurde, läßt darauf schließen, daß die isolierten Chloroplasten auch in isosmotischem Puffer keine intakte Membran mehr besitzen - obwohl etwa 90% im Phasenkontrastmikroskop glänzen, also ganz sein sollten.

Lyse der Chloroplasten mittels Ultraschall hatte dagegen stets eine Abnahme der Aktivität zu Folge. Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes variierte sehr von Präparation zu Präparation.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die beobachtete Reaktion vom Vorhandensein aller vier Nukleosidtriphosphate abhängig war, blieb zu beweisen, daß die gemessenen cpm tatsächlich auf die Aktivität einer RNA-Polymerase zurückzuführen sind; wenn dies der Fall ist, sollte

1.) die Reaktion DNA-abhängig,
2.) das Produkt durch RNase abbaubar sein.

---

[x] 1 Unit= die Enzymmenge, die in 10 min unter Standardbedingungen 1 nMol UMP einbaut.

Um dies zu prüfen, wurden zum Inkubationsansatz (mit osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten) 50 µg DNase/ml gegeben: und unter Bedingungen, welche ohne DNase einen Einbau von 8 500 cpm ergaben, wurde nichts eingebaut.
Wurde ein solcher Standardansatz 30 min mit 10 µg RNase/ml nachinkubiert, so sank die eingebaute Radioaktiviät auf 0 ab:

	10' Inkubation (ohne RNase)	40'Inkubation (ohne RNase)	10' Inkubation unter Standardbed., 30' Nachinkub. mit RNase
cpm	8 500	12 200	0

Wurde das cp-Lysat durch 30 min Zentrifugieren bei 24 000 x g in Membranfraktion und Überstand getrennt und beide Fraktionen auf Polymerase-Aktivität getestet, so fanden sich 75-95% der Aktivität des Gesamtlysats in der Membranfraktion wieder. Im Überstand ließ sich jedoch nie Polymerase-Aktivität nachweisen.

Mehrmaliges Waschen der Membranen mit Puffer S hatte keinen weiteren Aktivitätsverlust zur Folge.

Ein Nachteil der Inkubation mit gereinigten Membranen war jedoch, daß sie bei längerer Inkubationszeit als 10 min verklumpten und sich am Boden des Röhrchens absetzten. Dies erschwerte eine reproduzierbare Entnahme von Proben.

III.B.2.2. Versuche zur Solubilisierung einer aktiven RNA-Polymerase

Aus den Ergebnissen von Hallick (1976) und Schiemann (1978) ist zu entnehmen, daß die Euglena-cp-RNA-Polymerase sowohl durch ionische als auch durch hydrophobe Bindungen mit der cp-Membran assoziiert ist: nur durch kombinierte Behandlung mit EDTA und Detergenz konnte Enzymaktivität aus der Membranfraktion in den Überstand freigesetzt werden.
Daraufhin wurden hier verschiedene EDTA-Konzentrationen (zw. 1 mM und 5 mM) und verschiedene Triton X-100-Konzentrationen durchgetestet: aber es war in keinem Fall möglich, eine aktive Polymerase von den Membranen abzulösen. Die Aktivität nahm bei Zugabe von Triton zu einem Standardansatz mit osmotisch geschockten Chloroplasten drastisch ab: bereits bei einer Tritonkonzentration von 0,5% (ohne EDTA) war keine Aktivität mehr meßbar.

EDTA (ohne Triton) hemmte die Enzymaktivität bei einer Konzentration von 4 mM zu 60%.

Auch bei geringeren Triton - und EDTA-Konzentrationen, welche die Enzymaktivität im Chloroplasten-Gesamtlysat nur auf die Hälfte absinken ließen (0,1% Triton, 2 mM EDTA), blieb die gesamte restliche Aktivität an die Membranfraktion gebunden - nichts wurde in den Überstand freigesetzt.

Auch die Methode von Horgen und Key (1973), die RNA-Polymerase-Aktivität mit Ultraschallbehandlung bei 0,2 M $(NH_4)_2SC$ von Sojabohnenchloroplasten freisetzen konnten, führte hier nicht zum Erfolg.

Somit wurden weitere Versuche zur Charakterisierung der cp-RNA-Polymerase mit osmotisch geschockten Chloroplasten durchgeführt. Diese bieten gegenüber ganzen Chloroplasten den Vorteil, daß das Substrat ungehindert an den Syntheseort gelangen kann, sie zeigen hohe Enzymaktivität und liefern reproduzierbare Ergebnisse.

III.B.3.Charakterisierung der Polymerase-Aktivität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Zur Charakterisierung wurde die Beeinflussung der Polymerase-Aktivität durch Transcriptionsinhibitoren und Variation einzelner Parameter gemessen.

III.B.3.1. Der Einfluß einiger Transcriptionsinhibitoren

Der Einfluß folgender Transcriptionsinhibitoren auf die RNA-Polymerase-Aktivität im Chloroplastenlysat wurde getestet:

Ethidiumbromid (EtBr)
Actinomycin D
Rifamycin SV
α- Amanitin

Der Einbau von ^{3}H-markiertem UMP erwies sich als sehr empfindlich gegenüber EtBr und Actinomycin D (s. Abb.16). Beide Substanzen interkalieren zwischen Basenpaaren der DNA und machen somit die Matritze für eine Transcription unbrauchbar.

Rifamycin SV dagegen, ein Antibiotikum, das selektiv die Initiation hemmt, beeinflußt die Reaktion kaum: erst bei einer Konzentration von 400 µg/ml ist eine Abnahme des Einbaus zu verzeichnen (s. Abb.16).

Ebenfalls keinen Einfluß hat α- Amanitin, das die Polymerasen II und III aus Zellkernen sehr effektiv hemmt (Lindell et al., 1970; Weinmann und Roeder, 1974).

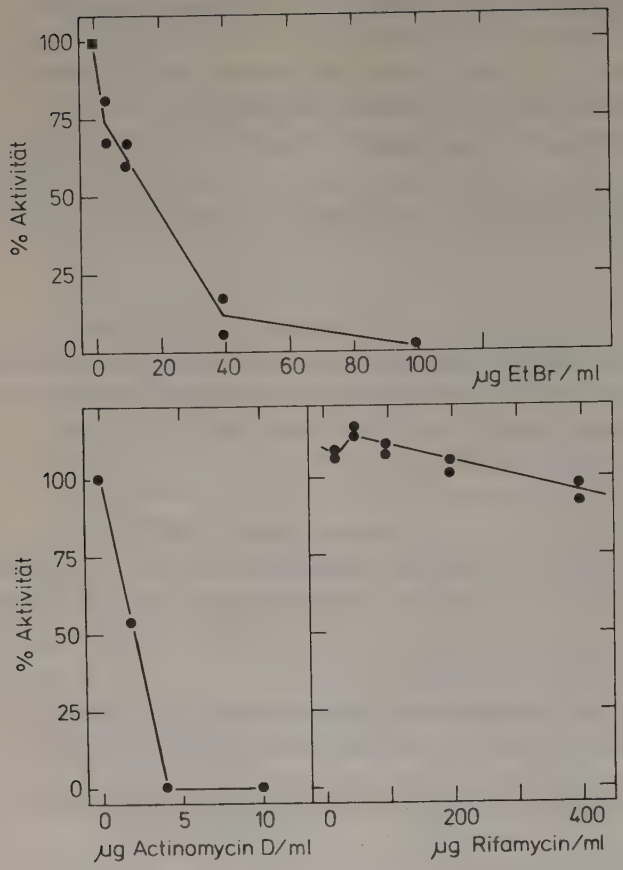


Abb.16: der Einfluß verschiedener Transcriptionsinhibitoren auf den Einbau von ^{3}H-UMP in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten unter Standardbedingungen (vgl. II.B.7.).

Die Aktivität ist in % Einbau des Kontrollansatzes ohne Antibiotikum (Ordinate) gegen die Hemmstoffkonzentration (Abszisse) aufgetragen.

III.B.3.2. Abhängigkeit von divalenten Kationen

Da die Verwertbarkeit von verschiedenen divalenten Kationen ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung der RNA-Polymerasen des Zellkerns ist, wurde hier der Einfluß von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die RNA-Synthese in osmotisch aufgebrochenen, mit ionenfreiem Puffer gewaschenen Chloroplasten untersucht: während im dargestellten Beispiel (Abb. 17) ohne Zusatz von divalenten Kationen nur ein Einbau von 960 cpm zu verzeichnen war, konnte die RNA-Synthese durch Zugabe von 5 mM $MgCl_2$ auf das 4,5fache stimuliert werden. Bei Konzentrationen zwischen 10 und 30 mM nahm die Enzymaktivität noch weiter zu, aber nicht mehr so steil. Statt Mg^{2+}-Ionen können offenbar auch Mn^{2+}-Ionen verwertet werden, jedoch weniger effektiv. Bei einer Ionenkonzentration von 5 mM betrug die Aktivitätsrate Mg^{2+}/Mn^{2+} 2,2.

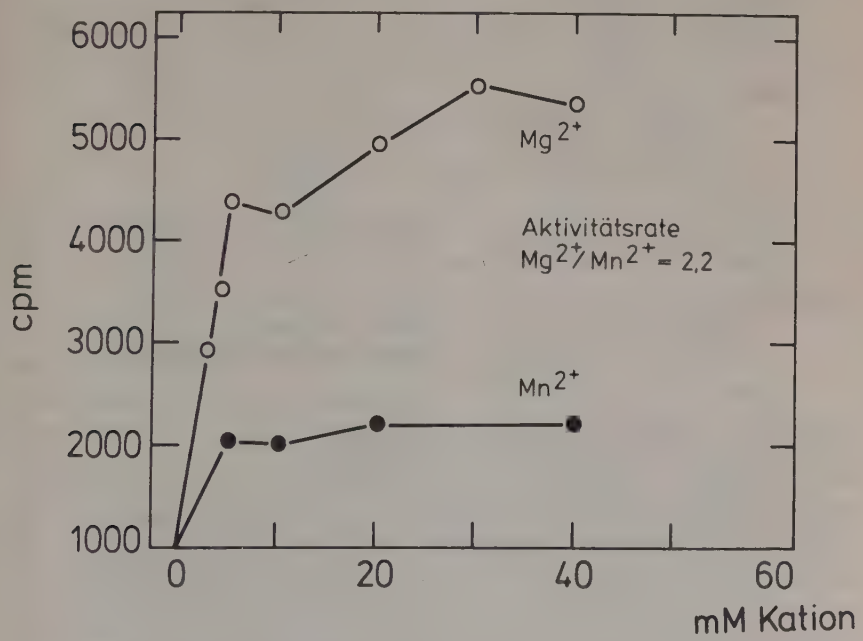


Abb.17: Der Einfluß von divalenten Kationen auf den Einbau von ^{3}H-UMP in die säurefällbare Fraktion von mit ionenfreiem Puffer (Puffer B) gewaschenen und danach osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten.

III.B.3.3. Der Einfluß verschiedener Ionenstärken

Die Chloroplasten wurden in Puffer S ohne NH_4^+ aufgenommen und die Nukleotidstammlösungen in Puffer P ohne NH_4^+ gelöst und die Ionenstärke im Ansatz variiert.
Es fällt auf, daß die Aktivität bei Erhöhung der Ionenstärke bis auf 112 mM NH_4^+ zunimmt und auch durch sehr hohe Ionenstärken kaum vermindert wird(Abb. 18).

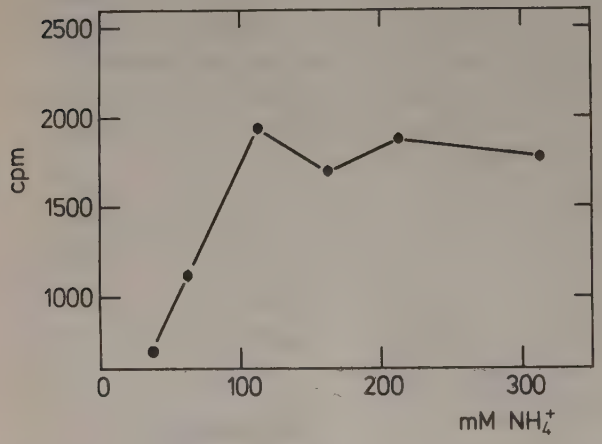


Abb.18: Der Einfluß der NH_4^+-Ionenkonzentration auf die Enzymaktivität. Standardansätze ohne NH_4^+ wurden mit 1/10 Volumen 10x konzentrierten NH_4^+-Lösungen 10 min bei 30°C inkubiert.

III.B.3.4. Verhalten gegen exogene DNA

Zur Prüfung des transcribierenden Systems auf seine Fähigkeit, exogen zugegebene DNA als Template zu benutzen, wurden 2 x in Puffer S gewaschene Membranen mit verschiedenen Mengen nativer und denaturierter (10 min gekocht) Kalbsthymus-DNA, gelöst in Puffer S, 10 min inkubiert. Die RNA-Polymerase konnte weder durch native noch durch denaturierte DNA stimuliert werden - im Gegenteil, DNA-Konzentrationen von mehr als 10 µg/ml hemmten die Enzymaktivität (s.Abb.19).

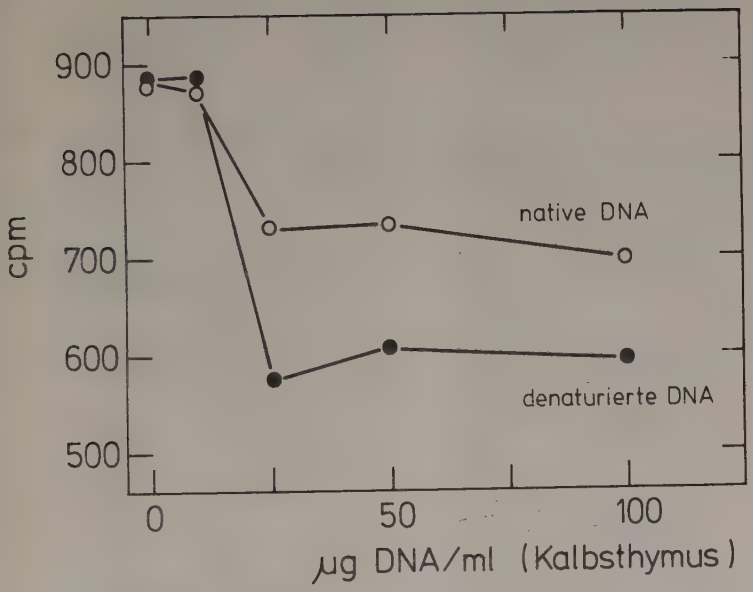


Abb.19: Einfluß von exogener DNA
cp-Membranen wurden unter Standardbedingungen 10 min mit nativer bzw. denaturierter Kalbsthymus-DNA inkubiert.

III.B.3.5. Der Einfluß von Licht

Entscheidend auf die Polymerase-Aktivität der Chloroplasten wirkte sich die Lichtintensität aus, bei der die Pflanzen vor dem Ernten kultiviert wurden: im Sommer war die Aktivität stets höher als im Winter. Wurden die Pflanzen drei Tage vor der Chloroplastenisolierung verdunkelt - eine Maßnahme, die bei der Isolierung der cp-DNA einen positiven Effekt hatte -, so war die Enzymaktivität nur mehr 1/10 so hoch. Aktivitätsraten aus Chloroplastenisolierungen zu verschiedenen Jahreszeiten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

III.B.3.6. Einfluß der genetischen Herkunft der Chloroplasten

berteriana-Chloroplasten zeigten stets höhere Enzymaktivitäten als odorata-Chloroplasten, die aus gleichaltrigen, unter vergleichbaren Bedingungen gezogenen Pflanzen stammten. Einige typische Einzeldaten sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: der Einfluß der genetischen Herkunft der Chloroplasten und der Licht-Bedingungen vor der Ernte auf die RNA-Polymerase-Aktivität (alle Pflanzen wurden im Alter von 8 Wochen geerntet)

Erntebedingungen	Datum der Ernte	Plastiden-Typ	Aktivität in osmotisch gesch. cp (Units/ mg Protein)
jeweils	29.1.	bert.	0,13
	29.1.	od.	0,07
um die	4.3.	bert.	0,19
	4.3.	od.	0,05
Mittagszeit	22.3.	bert.	0,20
	27.3.	od.	0,11
geerntet	3.5.	bert.	0,35
	3.5.	od.	0,21
3 Tage vor der Ernte verdunkelt	9.1.	bert.	0,02
	2.2.	bert.	0,02

III.B.3.7. Der Einfluß der Temperatur auf die RNA-Synthese in ganzen und in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten aus den reziproken Bastarden l.v mit berteriana- bzw. odorata-Plasma

Pfau (1979) wies bei ganzen, gereinigten berteriana- und odorata-Chloroplasten eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit der RNA-Polymerase-Aktivität nach: beide Chloroplastentypen hatten ein Aktivitätsoptimum um 30°C - aber während die Chloroplasten vom odorata-Typ bereits bei 50°C keine Aktivität mehr zeigten, war in den berteriana-Chloroplasten noch Aktivität nachweisbar.

Wurden jedoch statt ganzer Chloroplasten osmotisch aufgebrochene Chloroplasten verwendet, hob sich dieser Unterschied auf (vgl. Abb.20).

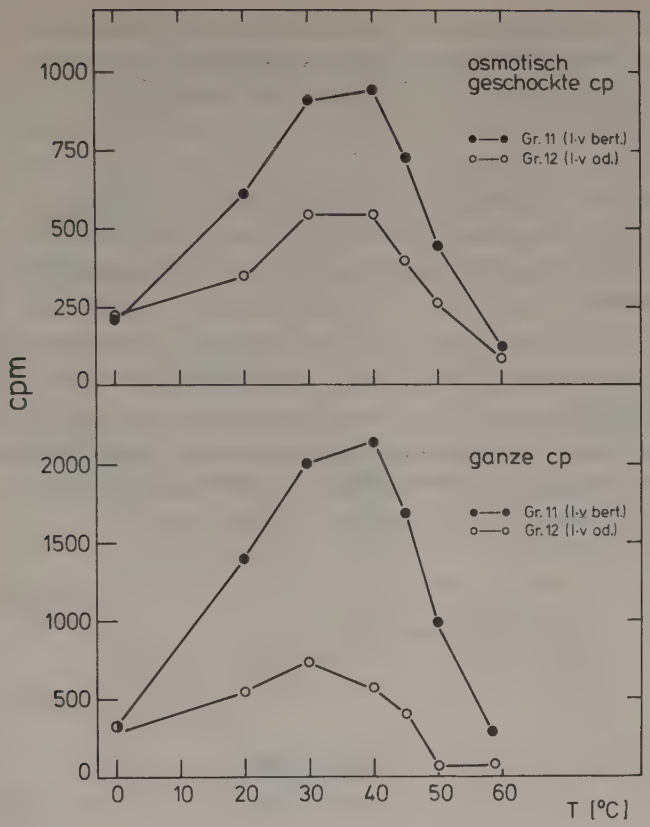


Abb.20: Der Einfluß der Temperatur auf die Polymerase-Aktivität in ganzen und in osmotisch aufgebrochenen berteriana- und odorata-Chloroplasten aus dem reziproken Bastardpaar 1.v.

III.B.3.8. Zeitabhängigkeit

Wurde bei pH 7,5 unter Standardbedingungen (vgl. II.B.7.) inkubiert, so stieg der Einbau von radioaktivem UMP bis zu einer Inkubationsdauer von 15, 20, - maximal 30 min linear an. Der Zeitpunkt, zu dem der maximale Einbau erreicht war, variierte je nach Chloroplastenpräparation, hing jedoch nicht vom Chloroplastentyp (berteriana oder odorata) ab. Entsprechende Versuche wurden mit Chloroplasten der reziproken Bastarde mit den Chromosomenkomplexen l und v und berteriana- bzw. odorata-Plasma durchgeführt. Allen Versuchsansätzen gemeinsam war jedoch ein Abfallen

der eingebauten Radioaktivität nach Erreichen des ersten Maximums und ein erneuter Anstieg. Das Minimum war durchschnittlich nach etwa 30-40 min erreicht, das zweite Maximum nach etwa 50-60 min. - Danach nahm die eingebaute Radioaktivität wieder ab.

Das Absinken der Radioaktivität sowohl nach dem ersten als auch nach dem zweiten Maximum ließ sich durch (t-)RNA (100 µg/ml), die vor Inkubationsbeginn zum Ansatz gegeben wurde, eindämmen.

Wurde die Zeitkurve aber bei pH 9 aufgenommen, so stieg der Einbau etwa 40 min linear an und erreichte nach etwa 50 min ein Plateau.

In Abb.21 ist eine Zeitkurve mit aufgebrochenen berteriana-Chloroplasten aus einer Oenothera l.v wiedergegeben, wie sie für die insgesamt sechs Ansätze typisch war.

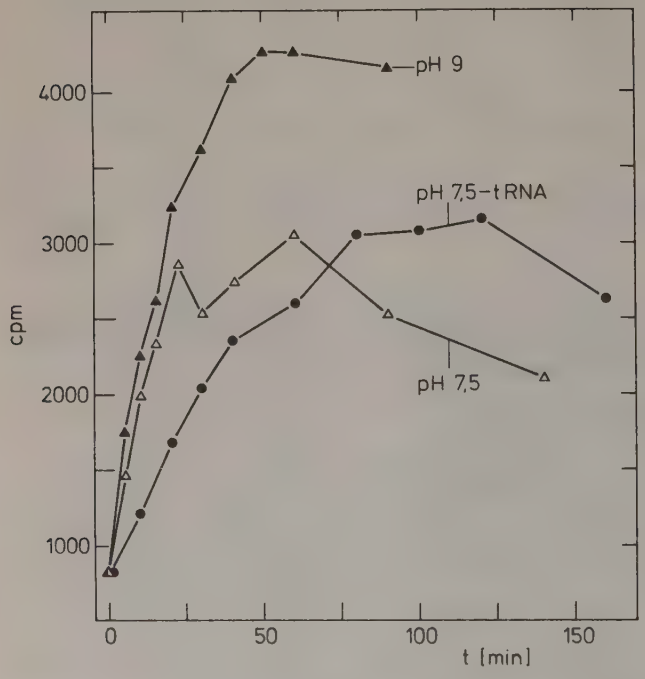


Abb.21: Die Zeitabhängigkeit der RNA-Synthese bei pH 7,5 und pH 9 und deren Beeinflussung durch den Zusatz von (t-)RNA (100 µg/ml).

III.B.3.9. Die pH-Optima in osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten und gereinigten Membranen

Wurde bei gleicher Inkubationsdauer der pH-Wert der Ansätze variiert, so erhielt man wieder eine Kurve mit zwei Maxima: bei pH 7,5 und bei pH 9 (s. Abb.22).

Bei Vorinkubation des Chloroplastenlysats mit ATP, CTP, GTP, 12,5 µM nicht radioaktivem UTP, für 25 min, und 10 min Nachinkubation mit markiertem UTP,erhielt man nur mehr ein Plateau im pH-Bereich zwischen 7,5 und 9 - keine zwei Maxima.

Das gleiche Phänomen trat auf, wenn man unter Standardbedingungen gewaschene Membranen statt eines Chloroplasten-Gesamtlysats bei verschiedenen pH-Werten inkubierte.

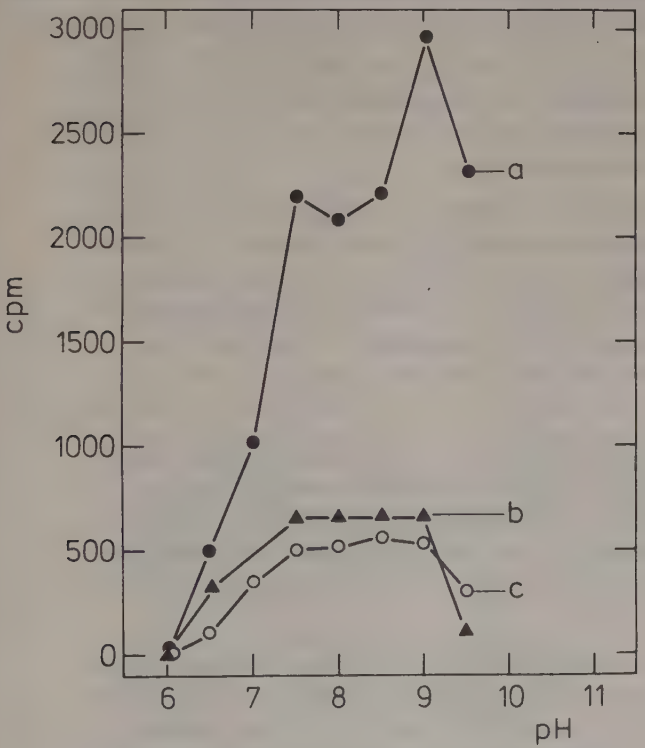


Abb.22: Die pH-Abhängigkeit der RNA-Synthese:
a) nach 10 min Inkubation mit lysierten Chloroplasten;
b) lysierte Chloroplasten, 25 min nur mit nicht radioaktiven Nukleosidtriphosphaten inkubiert, dann weitere 10 mit ^{3}H-UTP ;
c) gewaschene Membranen, 10 min inkubiert.

III.B.4. Charakterisierung der in vitro synthetisierten RNAs

Mit osmotisch aufgebrochenen berteriana-Chloroplasten wurde wie unter II.B.8. beschrieben RNA synthetisiert und die Reaktion bei verschiedenen pH-Werten jeweils zu verschiedenen Zeiten gestoppt, die Synthese-Produkte gereinigt und auf Gelen mit verschiedenen Trenneigenschaften elektrophoretisiert.

III.B.4.1. Inkubation bei pH 7,5

Wurde bei pH 7,5 (dem ersten Optimum, vgl. Abb.22a) kurze Zeit inkubiert (ca 10-15 min), so war die Größe des markierten Produktes auf einen relativ scharfen Bereich begrenzt. In Ermangelung eines geeigneten Markers läßt sich nur so viel sagen, daß das Produkt kleiner als die 16s rRNA und größer als die 5s RNA aus e. coli war (s.Abb.23/1).

Auf 1%igen Agarose- bzw. 2,4%igen PAA-Gelen mit 6 M Harnstoff, die zur Trennung der ribosomalen RNA von e. coli gut geeignet waren, ließ sich in keinem Fall Radioaktivität im Bereich der rRNA nachweisen.

Bei länger andauernder Inkubation wurde die Bande diffuser und driftete in den niedrermolekularen Bereich ab (nach etwa 25-45 min Inkubation). Erst nach einer Inkubationszeit von 45-60 min hob sich eine etwas stärker markierte Bande vom polydispersen Hintergrund ab - und zwar etwa an der Stelle der als RNase-Schutz zugegebenen tRNA aus Hefe (s. Abb.23 und Abb.25).

Noch längere Inkubationszeiten (bis zu 2 h) hatten keine weitere Veränderung im Fraktionierungsmuster zu Folge - der diffus markierte Hintergrund blieb erhalten, ebenso die blasse Bande im Bereich der tRNA - d.h. die Produktgröße wurde nicht durch unspezifisch wirksame RNasen weiter verringert.

Pulse-chase-Markierungen ergaben, daß die niedermolekulare Bande nicht auf ein Processing der höhermolekularen Bande zurückzuführen ist - denn sonst hätte z.B. das während 15 min pulse markierte Produkt (wie in Abb.23/1 und 25) während 45 min chase das niedermolekulare Produkt ergeben sollen - was aber nicht der Fall war. Stattdessen zerfiel das 15-min-Produkt während der Nachinkubation in RNA-Moleküle von breitem Größenbereich - was etwa ein Elektrophoresemuster wie in Abb. 23/2 ergab.

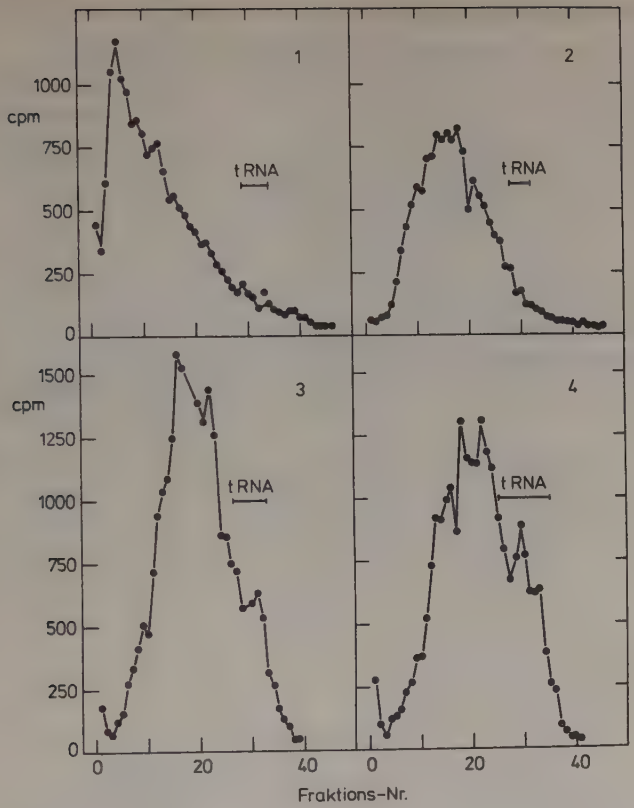


Abb.23: RNA-Synthese bei pH 7,5

Osmotisch aufgebrochene Chloroplasten wurden bei pH 7,5 mit ^{3}H-UTP inkubiert, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, daraus die RNA wie unter II.B.8. beschrieben gereinigt und auf 7,2%igen PAA-Rundgelen mit 6 M Harnstoff elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Anfärben der tRNA-Bande wurden die Gele in CO_2 gefroren, in 2mm-Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität ausgezählt.

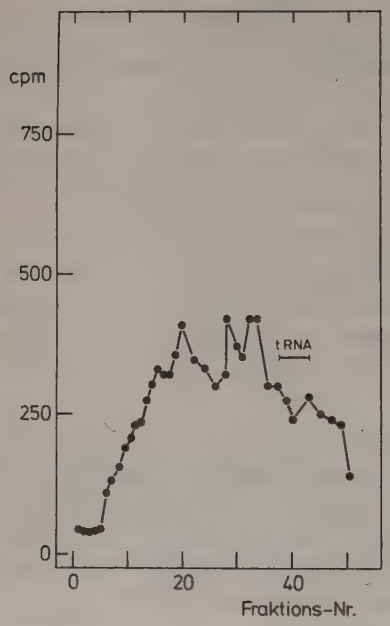
Fraktion 1 entspricht dem oberen Ende des Gels.

Abb.23/1: nach 15 min Inkubation
Abb.23/2: nach 30 min Inkubation
Abb.23/3: nach 45 min Inkubation
Abb.23/4: nach 60 min Inkubation

III.B.4.2. Inkubation bei pH 9

Wiederholung der oben angeführten Versuche bei pH 9 ergab, daß in keinem Fall ein Produkt von der Größe wie in Abb.23/1 markiert wurde.

Von Präparation zu Präparation etwas verschieden war dagegen schon nach 10-20 min Inkubation Radioaktivität in einem polydispersen und meist gleichzeitig im Bereich der tRNA sichtbar(vgl. Abb.25b). Die Intensität dieser niedermolekularen Bande nahm mit längerer Inkubationszeit noch etwas zu (vgl. Abb.24b und 25b). Diese Bande hob sich hier stets deutlicher vom Hintergrund ab als nach 45 min Inkubation bei pH 7,5, und war auch nach 2 h Inkubation noch vorhanden.



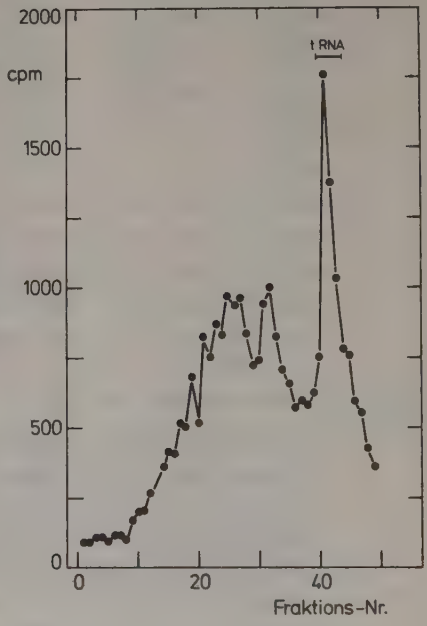


Abb.24a:
RNA-Synthese bei pH 9, nach 10 min Inkubation mit ^{3}H-UTP

Abb.24b:
RNA-Synthese bei pH 9, nach 30 min Inkubation mit ^{3}H-UTP

Die RNA wurde fraktioniert wie unter Abb.23 angegeben.

III.B.4.3. Autoradiographie der bei pH 7,5 und pH 9 synthetisierten RNA

Markierung der RNA mit ^{32}P-UTP unter den oben beschriebenen Bedingungen , Reinigung und Elektrophorese der Produkte auf Slabgelen und anschließende Autoradiographie führte etwa zu den gleichen Elektrophoresemustern wie die Markierung mit ^{3}H-UTP und anschließendes Fraktionieren auf Rundgelen (vgl. Abb.23 und 24 mit 25):

Während 10-15 min Inkubation bei pH 7,5 wurde ein Transcript höheren Molekulargewichts gebildet, das bei längerer Inkubationszeit in verschiedene Produkte zerfiel; nach 45-60 min Inkubation wurde RNA synthetisiert, die im Gel gleich weit wie exogen zugegebene tRNA wanderte.

Inkubation bei pH 9 führte schon nach kurzer Zeit zu einem Einbau im Bereich der tRNA, der sich nach längerer Inkubationszeit noch intensivierte - nie wurde jedoch ein höher molekulares Produkt einheitlicher Größe gebildet (vgl. auch Abb.21 und 22).

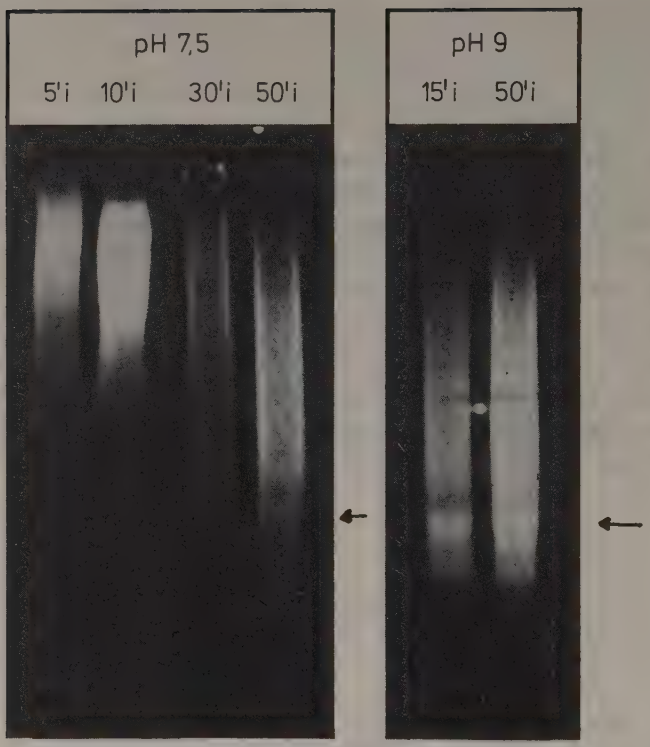


Abb.25: Autoradiographien der unter verschiedenen Bedingungen synthetisierten RNA

Osmotisch aufgebrochene Chloroplasten wurden bei pH 7,5 und pH 9 mit ^{32}P-UTP inkubiert, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die RNA nach dem Reinigen auf 7,2%-PAA-Slabgelen mit 6 M Harnstoff aufgetrennt.

Nach dem Färben wurden die Gele getrocknet und 12 h mit einem Röntgenfilm exponiert.

Durch Vergleich des gefärbten Gels mit der Autoradiographie wurde die Lage der tRNA ermittelt.

Die linke Hälfte zeigt die Elektrophoresemuster der RNA, die bei pH 7,5 nach 5, 10, 30 und 50 min Inkubation synthetisiert wurde, die rechte Hälfte die der RNA, die bei pH9 nach 15 und 50 min Inkubation isoliert wurde.

Die Lage der tRNA ist durch Pfeile markiert.

IV. DISKUSSION

Vorbemerkung:

Für die Versuche zur Charakterisierung der DNA wie der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Chloroplasten war zunächst zu prüfen, ob die Aussagekraft der Ergebnisse nicht durch die Gegenwart von mitochondrialer und nuklearer DNA und RNA-Polymerase beeinträchtigt würde.

Das Vorhandensein von ganzen Zellkernen in den Chloroplasten-Präparationen ließ sich durch mikroskopische Kontrolle ausschließen. Als weiteres Kriterium konnte die Reinheit der cp- von Kern- und mt-DNA herangezogen werden: wie Abb.3 zeigt, haben mindestens 80% der gereinigten DNA eine Schwebedichte von 1,698 g/cm^3. Dies entspricht dem Wert für Plastiden-DNA aus Euoenotheren (Herrmann et al., 1975). Im Dichtebereich der mt-DNA - nach Brennicke (1979) für Oenothera berteriana bei 1,710 g/cm^3 - ist dagegen im CsCl-Gradienten keine Bande erkennbar. Die restlichen 20% gehen auf Verunreinigung durch Kern-DNA mit einer Dichte von 1,703 g/cm^3 (Wert nach Herrmann et al., 1975) zurück, die wegen des zu geringen Dichteunterschiedes der beiden DNAs nicht besser abgetrennt werden kann. Da aber die Kern-DNA in Folge ihrer wesentlich komplexeren Struktur durch Restriktionsenzyme in eine Unzahl von elektrophoretisch nicht mehr trennbaren Fragmenten geschnitten wird, beeinträchtigte sie das Restriktionsmuster der cp-DNA als gleichmäßig blaß fluoreszierender Hintergrund nicht und stand dem eigentlichen Ziel der Arbeit nicht entgegen.

Aus dem natürlichen Verhältnis von cp-DNA/Kern-DNA von 1/20 bis 1/7 (Werte für Euglena gracilis nach Hallick et al., 1977) läßt sich berechnen, daß in der gereinigten DNA die Menge der ursprünglich vorhandenen Kern-DNA auf maximal 1/25 reduziert war.

Da die Chloroplasten für die Versuche mit der RNA-Polymerase auf die gleiche Weise gereinigt worden waren, war hier eine entsprechende Reduktion von nuklaren Enzymen zu erwarten, während eine Verunreinigung durch mt-RNA-Polymerase mit einiger Wahrscheinlichkeit auszuschließen war.

Wären größere Mengen Polymerase II und III im Ansatz vorhanden gewesen, so hätte die Reaktion mindestens teilweise durch α-Amanitin hemmbar sein sollen (Jendrisak und Guilfoyle,1978; Jendrisak,1979). Die völlige Unempfindlichkeit der gemessenen Reaktion gegen α-Amanitin - selbst in einer Konzentration von 100 µg/ml - entspricht Beobachtungen anderer Autoren über die plastidale RNA-Polymerase (z.B. Schiemann, 1978; Schiemann et al.,1977; Bottomley et al., 1971) und ist unvereinbar mit der Gegenwart von größeren Mengen Polymerase II und III. Da im Isolierungsgang für die Chloroplasten die Zellkerne aufgebrochen werden mußten, war hier eine Verunreinigung durch die α- Amanitin insensitive Polymerase I (Jendrisak,1979), die sonst nie im postnuklearen Überstand gefunden wird, zunächst nicht ganz auszuschließen. Da diese jedoch Mn^{2+} - gegenüber Mg^{2+} - Ionen vorzieht, war die in alleiniger Gegenwart von Mg^{2+} gemessene Reaktion mit einiger Sicherheit auf die Aktivität plastidaler RNA-Polymerase zurückzuführen.

Im Folgenden sollen nun zunächst die Ergebnisse diskutiert werden, die aus der Analyse der cp-DNA verschiedener Oenotheren-Formen hervorgingen.

Es hat sich gezeigt, daß sich die DNA nur dann spalten ließ, wenn sie völlig frei von Proteinen war. DNA - ohne weitere Reinigungsschritte aus osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten in ein CsCl-Kissen gesammelt (elektronenmikroskopische Aufnahme s. Abb.4a) war nicht spaltbar. Die DNA war hier zwar sehr hochmolekular, aber nicht ausmeßbar, da sie noch mit fremden Partikeln assoziiert war, die erst nach langer Proteinase-Behandlung verschwanden. Vermutlich handelte es sich bei diesen Partikeln um Reste der inneren Chloroplasten-Membran, an die die cp-DNA in vivo angeheftet ist. Erst die Reinigung über einen zweiten CsCl-Gradienten machte die DNA den Restriktionsenzymen zugänglich. Offenbar hatte aber die langwierige Reinigungsprozedur Brüche zur Folge: denn - während andere Autoren (z.B. Herrmann et al.,1975; Kolodner und Tewari, 1975) die Plastiden-DNA verschiedener Pflanzen als ringförmige Moleküle von 44-47 µm Länge beschreiben, wurden hier nur lineare Stücke zwischen 10 und 40 µm Länge gemessen.

Die Berechnung des Molekulargewichtes über die Addition der Molekulargewichte der einzelnen Restriktionsfragmente (vgl. Tabelle 3) ergab ebenfalls stets niedrigere Werte als in der Literatur - je nach Enzym zwischen 86 und 120 Kb (entsprechend 28 bzw. 39 µm Länge); hier ist die Verschiebung in den niedreren Bereich auf verschiedene Arten erklärbar:
entweder es liegen viele Stücke im niedermolekularen Bereich und sind unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr erfaßbar;
oder Fragmente aus der pro cp-DNA-Molekül doppelt vorhandenen ribosomalen Genregion wurden nur einmal gezählt;
oder Banden mit sehr ähnlichen Molekulargewichten wurden elektrophoretisch nicht mehr aufgelöst.

Tatsächlich traten vor allem bei den EcoR I-Mustern , wo die Fragmentsumme extrem niedrig war, besonders viele dicke Banden auf. Angesichts der Konservativität des Chloroplasten-Genoms ist es jedenfalls unwahrscheinlich, daß die cp-DNA der Munzia-Oenotheren wesentlich kleiner als die anderer Pflanzen sein sollte.

Restriktionsanalyse der hier untersuchten Plastiden aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata mit dem gleichen Enzym ergab keine signifikanten Unterschiede in den Fragmentsummen.

Dagegen ermöglichten Verschiebungen im Fragmentmuster von EcoR I, Kpn I und BamH I bzw. Bst I eine eindeutige Unterscheidung der beiden Plastidentypen: ohne Umweg über biochemische Reaktionen lieferten hier Verschiebungen in der Nukleotidsequenz einen direkten Beweis für die genetische Verschiedenheit.
Der Plastidentyp in zehn verschiedenen Bastarden, der bisher auf Grund kreuzungsgenetischer Untersuchungen postuliert, auf morphologischer und physiologischer Ebene charakterisiert und belegt war (vgl. Einleitung), fand hier seine Bestätigung in der Analyse der DNA:

Sowohl bei den reziproken Bastarden, in denen die Chromosomenkomplexe beider Eltern verschieden gemischt sind, als auch bei der durch Rückkreuzung gewonnenen Oenothera odorata (v.I) mit berteriana-Cytoplasma und -Plastiden ergab die Restriktionsanalyse immer das von früheren Ergebnissen her erwartete Bild.

Auch die cp-DNA der Oenotheren, welche die ursprünglichen Plastiden in fremdes Cytoplasma eingebettet enthalten (Oenothera v.I mit odorata-Plastiden in berteriana-Cytoplasma und Oenothera B.1 mit berteriana-Plastiden in odorata-Cytoplasma[x]), zeigte unverändert das Spaltmuster der cp-DNA aus der entsprechenden Elternform.

Nur eine einzige Form, für die auf Grund bisheriger Ergebnisse die genetische Konstitution v.I mit berteriana-Chloroplasten in odorata-Cytoplasma angenommen wurde, zeigte hier überraschend das Spaltmuster der odorata-Plastiden-DNA. Die Ursache hierfür soll noch genauer erforscht werden.

Insgesamt wurde aber gezeigt, daß die Plastiden - unabhängig von der Kombination der Chromosomenkomplexe und unabhängig von der Art des Cytoplasmas, das sie umgibt, -

---

[x] Restriktionsanalyse der mt-DNA aus der Oenothera B.1 mit berteriana-Chloroplasten in odorata-Cytoplasma (Brennicke, 1979), in der auf Grund ihres Blühverhaltens Cytoplasma vom odorata-Typ identifiziert wurde (B.Schwemmle,1962), bestätigte den odorata-Charakter der Mitochondrien dieser Oenotheren-Form.

ihre genetische Information unverändert beibehalten.

Auch nach über 40 Jahren Nachzucht durch Selbstung blieb die genetische Konstitution der Plastiden - soweit sich dies im Rahmen der Restriktionsanalyse behaupten läßt - in der Gegenwart fremder genetischer Systeme erhalten.

Nachdem im ersten Teil der Arbeit die bisherigen Ergebnisse zur genetischen Konstitution der Plastiden bestätigt wurden, bietet sich dieses wohl untersuchte System von Kern-Plasma-Kombinationen geradezu an, am Beispiel eines Schlüsselenzyms - wie es die plastidale RNA-Polymerase für die Proteinsynthese in den Chloroplasten zweifellos ist -, die Regulation der Zusammenarbeit zwischen Kern und Plasma aufzuklären.

Da über die DNA-abhängige RNA-Polymerase in Chloroplasten im allgemeinen jedoch recht wenig bekannt ist, erwies es sich als Voraussetzung für solche Studien, dieses Enzym in den Oenotheren-Chloroplasten zunächst nach herkömmlichen Kriterien zu untersuchen. Wenn es auch nicht gelang, das Enzym in aktivem Zustand zu isolieren, so war es möglich, über ein teilweise gereinigtes System einige Informationen über Aktivitätsoptima, Verhalten gegenüber Transcriptionsinhibitoren und Anzahl der RNA-Polymerasen in den Chloroplasten zu sammeln.

Was die strukturelle Untersuchung des Enzyms betrifft, so konnten zwar nach der an Euglena-gracilis-Chloroplasten entwickelten Triton/EDTA-Methode von Hallick et al. (1976) und Schiemann (1978) Proteine von der cp-Membran abgelöst werden, die bei Trennung über eine Sepharose-Säule ein vergleichbares Elutionsverhalten zeigten, jedoch konnte in keiner der Säulenfraktionen reproduzierbar RNA-Polymerase-Aktivität nachgewiesen werden. Bei Inkubation des gelösten 200 000 x g-Pellets wurde zwar Radioaktivität im säurefällbaren Material gemessen, aber es war nicht auszuschließen, daß diese unspezifisch durch Partikel festgehalten wurde, da das Pellet sehr schlecht löslich war und nach kurzer Zeit wieder ausflockte.

Analytische Untersuchungen über den Verbleib der im cp-Gesamtlysat gemessenen Aktivität ergaben, daß sie -sobald Triton und/oder EDTA zugegeben wurde- dramatisch abnahm,

daß die verbleibende Aktivität immer an die Membranen gebunden blieb und in keinem Fall in den 12 000 x g-Überstand freigesetzt wurde. Dies könnte heißen, daß entweder die Struktur des Enzyms durch die Triton/EDTA-Behandlung so geändert wird, daß es nicht mehr aktiv ist, - daß z.B. Untereinheiten abgelöst werden oder wichtige regulatorische Zusatzfaktoren, - oder aber, daß die Bindung des Enzyms an Strukturelemente des Chloroplasten so fest ist, daß eine Ablösung notwendig zu Zerstörung führen muß.

Früher veröffentlichte Solubilisierungsmethoden für verschiedene Objekte (z.B. Bottomley et al., 1971, bei Mais-cp mit EDTA/KCl; Horgen und Key, 1973, bei Sojabohnen-cp mit 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$ und Ultraschallbehandlung) erwiesen sich in anderen Labors an anderen Objekten (z.B. Schiemann,1978, an Euglena-cp)nicht als reproduzierbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß sich bei verschiedenen Objekten Struktur- und Bindungseigenschaften der Enzyme unterscheiden, sodaß noch keine allgemein zum Erfolg führende Solubilisierungsmethode gefunden wurde. - Von allen Autoren wird jedoch berichtet, daß die Solubilisierung des Enzyms immer mit einem Verlust an Aktivität verbunden ist.

Was die Identifizierung der Untereinheiten der plastidalen RNA-Polymerase betrifft, so kommen die meisten Hinweise bis jetzt aus der Arbeitsgruppe um Bogorad (z.B. Smith und Bogorad, 1974; Apel und Bogorad, 1976; Bogorad und Apel, 1976) und beziehen sich auf Maischloroplasten.

Wenn auch Anzahl und Funktion der plastidalen RNA-Polymerase-Untereinheiten noch nicht völlig geklärt sind, so scheint so viel sicher, daß das Enzym seiner Komplexität nach mit den nuklearen Polymerasen vergleichbar ist: während die virusspezifische RNA-Polymerase aus einer einzigen Polypeptidkette besteht (Chamberlin und Ring, 1973), die mitochondriale aus mehreren gleichen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von etwa 60 000 (Wintersberger,1973) besteht, ist das Chloroplastenenzym ähnlich bakteriellen und nuklearen Enzymen aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. - (Da alle bis jetzt gefundenen Polymerasen zur Initiation, Elongation und Termination von RNA-Ketten fähig sind, hat die Zunahme der Komplexität wahrscheinlich mit der zunehmenden Notwendigkeit von Kontroll- und Regulationsmechanismen zu tun.)
Bisherige Untersuchungen von Bogorad et al. (1977) ergaben, daß Polypeptide mit den Molekulargewichten 140 000 und 180 000 auf jeden Fall mit derRNA-Polymerase-Aktivität in Chloroplasten assoziiert sind.Inwieweit die übrigen Polypeptide mit Molekulargewichten von 100 000, 95 000, 85 000 und 40 000 echte Untereinheiten sind (Smith und Bogorad. 1974), ließ sich noch nicht belegen, da sie in verschiedenen

Präparationen in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen auftauchten. - Mullinix (1973) gibt die größte Untereinheit des Plastidenenzyms mit 220 000 an.

Auf Grund fehlender Enzymaktivität in den Säulenfraktionen kann hier ebenfalls nur vermutet werden, daß die gefundenen Polypeptide mit Molekulargewichten von 220 000, 135 000, 98 000, 94 000, 61 000, 37 000 und 10 000 Untereinheiten der Polymerase sind. - Es könnte auch sein, daß einige dieser Peptide nicht zum Enzym gehören, oder aber daß einige echte Untereinheiten des Enzyms während der Präparation verloren gegangen sind, und daß darin der Grund für den Aktivitätsverlust zu suchen wäre.

Zur Charakterisierung der Polymerase-Aktivität war es daher notwendig, auf ein relativ ungereinigtes, aber aktives System zurückzukommen: ganze oder osmotisch aufgebrochene Chloroplasten oder gereinigte Membranen.

Zunächst wurde der Einfluß einiger Transcriptionsinhibitoren auf die Enzymaktivität untersucht. Hinsichtlich der Hemmbarkeit durch EtBr und Actinomycin D deckten sich die Befunde mit denen anderer Autoren (z.B. Schiemann, 1978; Hallick et al., 1976) . Ebenso bestätigt werden konnte die Unempfindlichkeit gegenüber α-Amanitin. Überraschend dagegen blieb die Enzymaktivität völlig unbeeinflußt von Rifamycin SV - selbst bei einer Konzentration von 400 µg/ml.

Den Berichten anderer Autoren zu Folge ist die Hemmbarkeit des Chloroplastenenzyms durch Rifamycin sehr von den Inkubationsbedingungen abhängig. Nach Wollgiehn und Munsche (1972) z.B. ist die RNA-Synthese in gereinigten Chloroplasten nicht hemmbar, in ungereinigten Chloroplasten teilweise hemmbar. Nach Bottomley et al. (1971) ist das gereinigte Enzym bei niedriger Ionenstärke unempfindlich gegen Rifamycin, bei 125 mM NH_4Cl dagegen wird die Aktivität um 35% vermindert. Bei Versuchen von Schiemann (1978) erwies sich die Reaktion in Euglena-Chloroplasten in vivo als Rifamycinsensitiv, in flotierten ganzen oder osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten dagegen nicht.
Da Rifamycin selektiv die Initiation hemmt, ist anzunehmen, daß der hier gemessene Einbau nur auf Verlängerung in vivo angefangener Ketten zurückzuführen war, daß die Situation in vitro insofern nicht ganz den in vivo Bedingungen entsprach. Für eine spezielle Untersuchung der Initiation müßten also die Bedingungen - z.B. durch Variation der Ionenstärke - geändert werden.

Was die Steigerung der Aktivität durch divalente Kationen betraf, so waren sowohl Mg^{2+} als auch Mn^{2+} wirksam. Mg^{2+}

jedoch konnte offenbar besser genutzt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Hallick et al. (1976) überein. Andere Informationen gehen dahin, daß das cp-Enzym keine Mn^{2+}-Ionen verwerten kann (Bottomley et al.,1971), bzw. sogar durch Mn^{2+}-Ionen gehemmt wird.(Schiemann, 1978).

Bei Erhöhung der Ionenstärke bis 112 mM NH_4^+ nahm die Enzymaktivität kontinuierlich zu, blieb allerdings bei hohen Ionenstärken (bis 300 mM) im Gegensatz zu Angaben anderer Autoren unverändert hoch. Dies spricht für eine hohe Stabilität der Template-Bindung gegen das äußere Ionenmilieu, ähnlich wie bei der nuklearen Polymerase II (Duda, 1976).

Exogen angebotene DNA konnte weder im nativen noch im denaturierten Zustand als Template genutzt werden. Da für diese Versuche osmotisch aufgebrochene Chloroplasten verwendet wurden, kann dies nicht mit der Undurchlässigkeit der Membran für die exogene DNA erklärt werden - vielleicht aber durch eine Template-Spezifität oder durch die Unfähigkeit zur Termination bzw. Initiation der RNA-Polymerase in diesem in vitro System. Die Hemmung der Enzymaktivität bei höheren Dosen fremder DNA kann entweder aus der Konkurrenz um spezifische Bindungsstellen erklärt werden, oder aber durch eine unspezifische polyanionische Wirkung der DNA. Für diese Möglichkeit spricht, daß bei den Versuchen von Schiemann (1978) mit Euglena-Chloroplasten die inhibierende Wirkung der exogenen DNA durch das Polykation Spermidin teilweise kompensierbar war.

Entscheidenden Einfluß auf die RNA-Polymerase-Aktivität hatten die Kulturbedingungen, denen die Pflanzen vor der Chloroplastenisolierung ausgesetzt waren. Denn - da die Gewächshäuser nicht völlig gegen äußere Einflüsse abgeschirmt waren,- änderten sich die Licht- und Wärmeverhältnisse mit den Jahreszeiten. Wie Tabelle 4 zeigt, stieg die Aktivität mit der Tageslänge an. Chloroplasten aus Pflanzen, die vor der Ernte verdunkelt worden waren, zeigten nur einen geringen Bruchteil der Aktivität. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren (z.B. Harel und Bogorad, 1973; Apel und Bogorad, 1976) über eine lichtabhängige Zunahme der RNA-Synthese in Chloroplasten überein.

Die genetische Struktur der Plastiden hatte nur quantitative,

keine qualitativen Auswirkungen auf die RNA-Synthese: der V e r l a u f der Aktivitätskurven war in allen untersuchten Fällen bei berteriana- und odorata-Chloroplasten aus 1.v-Pflanzen gleich, ebenso die Größe der in vitro synthetisierten Produkte; stets jedoch zeigten die berteriana-Plastiden höhere Aktivität als die odorata-Plastiden, wenn die Versuchspflanzen unter gleichen Bedingungen angezogen und die Chlroplasten bzw. die Chloroplastenlysate unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Dies könnte entweder heißen, daß verschiedene Mengen an RNA-Polymerase vorliegen oder daß bei gleicher Konzentration das Enzym in den odorata-Plastiden weniger effektiv arbeitet. Der Grund hierfür könnte in einer Verschiedenheit der Enzyme selbst zu suchen sein - was aber, da die RNA-Polymerase nach dem gegenwärtigen Stand der Forschungen vom Kern codiert wird und die Versuchspflanzen das gleiche Genom hatten, unwahrscheinlich ist -, oder aber in einer gewissen Disharmonie im Zusammenwirken von Kern und Plasma bei der Kombination 1.v mit odorata-Plastiden.

Bisherige Untersuchungen von J.Schwemmle (1937) und B.Schwemmle (1962) weisen auf eine gewisse Unverträglichkeit von odorata-Plastiden mit dem fremden 1-Komplex hin, was sich am dramatischsten bei der Kombination von odorata-Plastiden mit den Komplexen 1 und I äußert: hier sind die Pflanzen blaß, kränklich und hinken in ihrer ganzen Entwicklung den 1.I mit berteriana-Plasma weit hinterher. Bei den 1.v mit odorata-Plasma wurde nur in den ersten Selbstungsgenerationen eine solche Unverträglichkeit beobachtet - danach"erholten" sich die Pflanzen (wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, ist dieser Erholungseffekt aber nicht auf eine Veränderung der genetischen Konstitution der Plastiden zurückzuführen!). Eine restliche "Disharmonie" könnte in diesem Fall durch eine Modifizierung der Enzymaktivität durch regulatorische Zusatzfaktoren zum Ausdruck kommen, die entweder nur von der Plastiden-DNA oder von beiden genetischen Systemen codiert werden. Weitere Vergleiche von Plastiden aus verschiedenen Kern-Plasma-Kombinationen könnten hier weiter führen.

Durch Inkubation ganzer odorata- und berteriana-Plastiden wurde zunächst versucht, das Temperatur-Optimum der RNA-Polymerase zu ermitteln. In Einklang mit früheren Untersuchungen von Pfau (1979) zeigten beide Plastidentypen für dieses Enzym ein Temperaturoptimum um 30°C; die odorata-Plastiden waren jedoch wesentlich empfindlicher gegenüber höheren Temperaturen.Da sich dieser Unterschied aber aufhob, wenn statt ganzer Chloroplasten Lysate inkubiert wurden,

ist dieser Unterschied in der Hitzeempfindlichkeit mit größerer Wahrscheinlichkeit in strukturellen Verschiedenheiten der Membranen begründet als in einer Verschiedenheit der Enzyme selbst. Hohe Temperaturen könnten z.B. bei den odorata-Plastiden Strukturänderungen der Membran bewirken, welche die Durchlässigkeit für Nukleotide vermindern.

Überraschende Befunde lieferten die Versuche zur Zeit- und pH-Abhängigkeit. Sowohl die Variation der Inkubationszeit bei pH 7,5 als auch die Variation des pH-Wertes bei 10 Min Inkubation führte zu Kurven mit zwei Maxima.

Die Abnahme der Radioaktivität in der säurefällbaren Fraktion nach 30-40 Min Inkubation bei pH 7,5 konnte durch Zugabe von (t-)RNA aufgehoben werden, - ebenso durch Änderung des pH-Wertes auf 9 (vgl. Abb.21).

Dieser Verlauf der Zeitkurve ist auf verschiedene Weise erklärbar:
1.) Neben e i n e r RNA-Polymerase sind RNasen im Ansatz wirksam, welche - bei gleichbleibender Aktivität der RNA-Polymerase - dann ihr Maximum an Aktivität erreichen, wenn der geringste Einbau gemessen wird, sodaß sich im Minimum der Kurve Abbau und Synthese von RNA ausgleichen.
Diese RNasen sind bei pH 9 weniger wirksam und vermögen dann die RNA-Synthese nicht zu beeinflussen.
Um den zweiten Anstieg der Zeitkurve bei pH 7,5 zu erklären, müßte aber die Aktivität dieser RNasen nach 40-50 Min Inkubation wieder abnehmen - was jedoch unwahrscheinlich ist, da RNasen erfahrungsgemäß sehr stabile Enzyme sind.
2.) Bei pH 7,5 entwickeln nacheinander z w e i RNA-Polymerasen maximale Aktivität: eine bereits nach kurzer Inkubationszeit, deren Produkte jedoch physikalisch labil sind oder schnell durch RNasen abgebaut werden, was sich in einem Fallen der Kurve (nach etwa 30 Min Inkubation) äußert; der zweite Anstieg der Kurve wird durch die Aktivität einer zweiten Polymerase verursacht, die bei pH 9 die Wirkung des ersten Enzyms übertrifft, sodaß dann der Einbau bis etwa 30-40 Min linear zunimmt, bis ein Plateau erreicht ist.

Daß das Minimum der Zeitkurve bei pH 7,5 durch Zugabe von (t-)RNA im Überschuß "ausgebügelt" werden kann, spricht dafür, daß es auf die Aktivität von RNasen zurückzuführen ist.

Der zweite Anstieg jedoch ist dadurch nicht erklärbar.- Deutlicher wird das Bild durch die Ergebnisse aus den pH-Versuchen (vgl. Abb.22).
Wieder traten (bei 10 Min Inkubationszeit) zwei Maxima auf: bei pH 7,5 und bei pH 9. Eine Erklärung dafür wäre die, daß e i n e RNA-Polymerase zunächst bei pH 7,5 ihre optimale Aktivität entfaltet, die bei pH 8 und 8,5 vergleichsweise absinkt, dann aber wieder - etwa auf Grund von Konfigurationsänderungen im Template (Aufschmelzen von AT-reichen Sequenzen)- bei pH 9 ansteigt. Allein damit ist aber nicht erklärbar, daß sich - nach 25 Min Vorinkubation und 10 Min Markierung - an Stelle der zwei Gipfel ein durchgehendes Plateau zwischen pH 7,5 und pH 9 erstreckt. Nach dem gegenwärtigen Stand muß dies als weiterer Hinweis auf die Wirksamkeit von zwei RNA-Polymerasen anzusehen sein:
nach 25 Min Vorinkubation sollte die Aktivität des ersten, nur bei pH 7,5 wirksamen Enzyms erschöpft und der folgende Einbau allein auf die Tätigkeit des zweiten Enzyms zurückzuführen sein, das evtl. einen breiteren pH-Wirkungsbereich hat.

Wurden statt Geamtlysaten von Chloroplasten gewaschene Membranen bei verschiedenen pH-Werten 10 Min inkubiert, so hatte der daraus resultierende Einbau ebenfalls ein breites pH-Optimum. Dies würde - der Hypothese entsprechend - heißen, daß das "empfindlichere" (nur in engem Bereich um pH 7,5 wirksame) Enzym in diesem Ansatz nicht mehr aktiv war und daß das zweite Enzym membrangebunden ist.

Ebenfalls aus der Zweigipfeligkeit der pH-Kurve schloß Joussaume (1973) auf die Existenz von zwei verschiedenen RNA-Polymerasen in (Erbsen-)Chloroplasten: einer membrangebundenen mit einem Wirkungsoptimum bei pH 8,5, die exogen zugegebene Kern- und cp-DNA als Template verwerten konnte, und einer im Stroma lokalisierten, mit Optimum bei pH 9, die nur mit cp-DNA aktiv war.

Was die Analyse der nach verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen pH-Werten synthetisierten Produkte betrifft, muß vorausgeschickt werden, daß diese allein auf Grund ihrer elektrophoretischen Wanderungseigenschaften nicht eindeutig mit in vivo synthetisierten Produkten identifiziert werden können. - Ob das bei pH 9 gebildete 4s-Produkt tatsächlich tRNA ist und nicht etwa das Transcript AT-reicher Sequenzen, die hier wahrscheinlich aufgewunden vorliegen und somit einer RNA-Polymerase leichter zugänglich sind, müßte

noch genauer untersucht werden - beispielweise durch Hybridisieren der RNA an Restriktionsfragmente der DNA (Methode nach Southern, 1975).

Denn - daß hier - wie bei allen in vitro Systemen - die Situation nur teilweise mit der in vivo vergleichbar ist, geht aus Berichten verschiedener Autoren hervor: nach bisherigen Informationen werden in Chloroplasten außer tRNA (vgl. Haff und Bogorad, 1976) auch rRNAs (z.B. Bohnert et al., 1976; Hartley,1979) und einige mRNAs (z.B. Wollgiehn et al., 1978) gebildet.

Was aber die Charakterisierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase betrifft, so ergänzen die Elektrophoresebilder die aus der Zeit- und pH-Abhängigkeit gewonnenen Befunde: Eine konkrete, höhermolekulare Bande trat nur dann auf, wenn kurze Zeit bei pH 7,5 markiert wurde (vgl. Abb.23/1 und Abb.25), entsprechend dem ersten Anstieg in der Zeitkurve (s.Abb.21). Erst nach längerer Inkubationszeit war hier die Synthese eines niedermolekularen Produktes von ca 4s zu verzeichnen (vgl. Abb. 23/4 und Abb.25). Das Abdriften der Produktgröße in den niedrermolekularen, diffusen Bereich bei längerer Inkubation könnte entweder heißen, daß eine Menge verschieden großer Molekülklassen synthetisiert - oder, was mit größerer Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist, das höhermolekulare Produkt abgebaut wurde.
Dagegen wurde bei pH 9 schon nach kurzer Zeit Radioaktivität in die tRNA-Fraktion eingebaut (vgl. Abb.25). Eine höhermolekulare, konkrete Bande fehlte.

Aus dem Gesamtbild der zuletzt dargelegten Ergebisse ergibt sich nun folgender Schluß:
Es existieren zwei DNA-abhängige RNA-Polymerasen in Chloroplasten:

1.) Eine schnell arbeitende "Polymerase I",
mit engem Wirkungsbereich um pH 7,5,
deren Produkte labil sind,
die so empfindlich ist, daß sie ihre Aktivität bereits bei einer EDTA- und detergenzfreien Trennung des Chloroplastenlysats in Membranfraktion und Überstand einbüßt.

2.) Eine "Polymerase II",
mit breitem Wirkungsbereich zwischen pH 7,5 und pH 9,
die jedoch bei pH 9 effektiver arbeitet,
deren Produkte stabil sind,
die mit der Chloroplastenmembran assoziiert ist, - und zwar so eng, daß sie beim Versuch der Solubilisierung ebenfalls zerstört wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war ein System verschiedener Kern-Plasma-Kombinationen aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata, deren genetische Konstitution bereits auf Grund kreuzungsgenetischer, morphologischer und physiologischer Untersuchungen definiert war. Während im ersten Teil der Arbeit die DNA in den Chloroplasten dieser Oenotheren untersucht wurde, diente der zweite Teil der Charakterisierung des Enzyms, das den ersten Schritt zur Realisierung der Information dieser DNA katalysiert: der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Chloroplasten.

Als Hauptergebnisse sind hervorzuheben:

Die Analyse der DNA aus den Chloroplasten der Oenothera berteriana und der Oenothera odorata mit den Restriktionsendonukleasen BamH I/Bst I, EcoR I und Kpn I ermöglichte eine eindeutige Unterscheidung der beiden Plastome.

Diese Unterschiede erwiesen sich auch dann als reproduzierbar,
- wenn die cp-DNA aus Bastarden isoliert wurde, deren genetische Information im Zellkern aus Chromosomenkomplexen beider Elternformen verschieden gemischt war,
- wenn die Plastiden der einen Art mit dem gesamten Genotypus der anderen Art kombiniert
- oder vom Cytoplasma der anderen Art umgeben waren.

D.h. daß sich die DNA in den Chloroplasten weder unter dem Einfluß eines fremden Kerns noch unter dem Einfluß eines fremden Cytoplasmas verändert hat.

Die Untersuchung der RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten, Chloroplastenlysaten und -membranpräparationen unter verschiedenen Bedingungen führte zu der Hypothese, daß in den Oenotheren-Chloroplasten zwei DNA-abhängige RNA-Polymerasen aktiv sind:

1.) eine bereits nach kurzer Inkubationszeit wirksame "Polymerase I", mit engem pH-Optimum um 7,5, deren Produkte labil sind, und die so empfindlich ist, daß sie ihre Aktivität bereits bei einer Trennung des Chloroplastenlysats in Membranfraktion und Überstand einbüßt.

2.) Eine "Polymerase II",
mit breitem Wirkungsbereich zwischen pH 7,5 und pH 9,
die jedoch bei pH 9 effektiver arbeitet,
und bei pH 7,5 langsamer als Polymerase I,
deren Produkte stabil sind,
die mit der Chloroplastenmembran assoziiert ist, - und
zwar so eng, daß sie beim Versuch der Solubilisierung
ebenfalls zerstört wird.

VI. ANHANG

Restriktionsanalyse der cp-DNA aus Oenothera argentinae[x] und Oenothera hookeri

Wie bereits in der Einleitung erörtert, sind die Wirkungsbereiche der genetischen Systeme in Kern und Plasma sehr eng verflochten. Es ist daher zu erwarten, daß Mutationen im Genom nur dann dem Selektionsdruck standhalten, wenn durch sie die Harmonie zwischen Kern und Plasma nicht beeinträchtigt wird. Größere Änderungen im Genom müssen somit ihre Entsprechung in der extrachromosomalen DNA haben.

Organellen-DNA ist aber auf Grund ihrer geringeren Komplexität übersichtlicher und leichter charakterisierbar als Kern-DNA: so wird sie z.B. durch ein Restriktionsenzym nur in eine begrenzte Anzahl von Fragmenten geschnitten, die elektrophoretisch trennbar sind und für jede DNA-Sorte ein typisches Bandenmuster ergeben. Restriktionsanalyse der Organellen-DNA kann also bei wesentlich geringerem Aufwand für verwandtschaftliche Untersuchungen von ähnlichem Nutzen sein wie ein Vergleich der Kern-DNA.

In Ergänzung zur Restriktionsanalyse der cp-DNA aus der Oenothera odorata und der Oenothera berteriana wurden hier nun die cp-DNAs aus zwei weiteren Oenotheren untersucht: aus der Oenothera odorata (v.I) mit den Plastiden der Oenothera argentinae [xx] und aus der Oenothera hookeri.

Die Oenothera argentinae gehört wie die Oenothera berteriana und die Oenothera odorata zur Sektion Munzia, ist ebenfalls einjährig und stammt aus Südamerika. Frühere Untersuchungen haben ergeben, daß sie wie die Oenothera odorata eine quantitative Langtagpflanze ist (B.Schwemmle,1962) und auch sonst der Oenothera odorata ähnlicher als der Oenothera berteriana.

Auch nach den systematischen und populationsgenetischen Untersuchungen von Dietrich (1977) ist die heterozygote Oenothera odorata über den v-Komplex von der Oenothera affinis näher mit der Oenothera argentinae verwandt als die

---

x) Nach der systematischen Bearbeitung von Dietrich (1977) ist die Oenothera argentinae (Erlangen) jetzt in Oenothera indecora sspec. bonariensis umbenannt.

xx) zur Herkunft dieser Form s. J.Schwemmle und Zintl(1939).

Oenothera berteriana, und ihr natürliches Verbreitungsgebiet liegt dem der Oenothera argentinae näher als dem der Oenothera berteriana (vgl. Abb.28).

In Übereinstimmung damit zeigte die DNA der argentinae-Plastiden nach Behandlung mit BamH I ein Restriktionsmuster, das sich zwar vom dem der odorata- und dem der berteriana-Plastiden eindeutig unterschied, jedoch mehr zum odorata-Typ tendierte.

Abb.26:
Vergleich der BamH I-Fragmente der cp-DNA aus der Oenothera odorata (v.I; Mitte) mit argentinae-Plastiden mit denen des odorata- und des berteriana-Plastoms am Beispiel des reziproken Bastardpaares B.v.

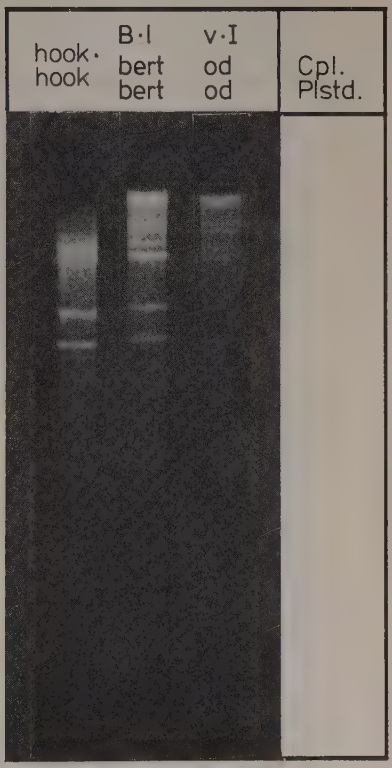


Abb.27:
Vergleich der Sal-Fragmente der cp-DNA aus der Oenothera hookeri (hook.hook; links) mit den Sal-Fragmenten des odorata- und des berteriana-Plastoms der beiden Elternformen (v.I bzw. B.l).

Die vielen gemeinsamen Banden der drei Plastidentypen stehen in Einklang mit der These von Dietrich (1977), daß die Herausbildung verschiedener Plastome evolutionsgeschichtlich noch jung ist und sich innerhalb der Sektion Munzia erst nach der Abspaltung der Serie Allochroa von der Serie Renneria ereignet hat.

Ganz anders verhält sich hier die cp-DNA der nordamerikanischen, zur Sektion Euoenothera gehörigen Oenothera hookeri (hook.hook): der Unterschied des Plastoms dieser Oenothere zu dem der Munzia-Oenotheren ist bei der Restriktionsanalyse wesentlich größer als der Unterschied zwischen den Munzia-Plastomen untereinander.

Diese Übereinstimmung im Verwandtschaftsgrad der Restriktionsmuster der cp-DNAs mit den Ergebnissen systematischer und entwicklungsgeschichtlicher Studien rechtfertigt hier - wie beispielsweise auch in der Arbeit von Timothy et al. (1979) über die Organellen-DNA verschiedener Mais-Rassen - die Restriktionsanalyse von Chloroplasten-DNA als leicht zu handhabendes Instrument künftiger Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Abb.28: Skizze nach Dietrich (1977) über die natürlichen Verbreitungsgebiete der Oenothera odorata (v.I),▲ der Oenothera argentinae (ha.ha)△ und der Oenothera berteriana (B.1)○ innerhalb Südamerikas

VII. LITERATURVERZEICHNIS

APEL, K. and BOGORAD, L. (1976): Light induced increase in activity of maize plastid DNA-dependent RNA-polymerase. Eur. J. Biochem. 67, 615-620

BAUR, E. (1909): Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "varietas albumarginatae hort" von Pelargonium zonale. Z. Vererbungslehre 1, 330-351

BENZ, R. (1979): Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipidzusammensetzung ihrer Membranen (Vergleichende Untersuchungen bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution). Dissertation, Tübingen

BLAMIRE, J., FLECHTNER, V. R., and SAGER, R. (1974): Regulation of nuclear DNA-replication by the chloroplast in Chlamydomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2867-2871

BOGORAD, L., APEL, K. and HAFF, L. A. (1977): DNA-dependent RNA-polymerases of Zea mays. Acides nucleiques et synthese des proteines chez les vegetaux (Bogorad and Weil eds.) 261, Paris, CNRS, 169-177

BOHNERT, H. J., DRIESEL, A. J. and HERRMANN, R. G. (1976): Characterization of the RNA compounds synthesized by isolated chloroplasts. In "Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria" (Th.Bucher et al. eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 629-636

BOTTOMLEY, W., SPENCER, D., WHEELER, A. M. and WHITFELD, P. R. (1971): The effect of a range of RNA-polymerase inhibitors on RNA synthesis in higher plant chloroplasts and nuclei. Arch. Biochem. Biophys. 143, 269-275

BOTTOMLEY, W., SMITH, H. J. and BOGORAD, L. (1971): RNA-polymerases of maize: partial purification and properties of the chloroplast enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. 68,2412-2416

BOTTOMLEY, W. and WHITFELD, P. R. (1979): Cell free transcription and translation of total spinach cp-DNA. Eur. J. Biochem. 93, 31-39

BRENNICKE, A. (1979): Untersuchung der mitochondrialen DNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Dissertation, Tübingen

CHAMBERLIN, M. J. and RING, J. (1973): Characterization of T7-specific RNA-polymerase. J. Biol. Chem. 248, 2235-2244

CHELM, B. K., HALLICK, R. B. and GRAY, P. W. (1979): Transcription program of the chloroplast genome of Euglena gracilis during chloroplast development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76/5, 2258-2262

CHRISTNER, H. J. (1973): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Flavonoidsynthese. Dissertation, Tübingen

CHUN, E. H. L., VAUGHAN, M. H., and RICH, A. (1963): The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. J. Mol. Biol. 7, 130-141

CLELAND, R. E. (1972): Oenothera . Academic Press Inc., London

CORRENS, C. (1909): Vererbungslehre mit blass-(gelb-)grünen und buntblättrigen Sippen bei Mirabilis, Urtica und Lunaria. Z. Vererbungslehre 1, 291-329

DIETRICH, W. (1977): The South American species of Oenothera sect. Oenothera (Raimannia, Renneria, Onagraceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 64/3,425-626

DUDA, C. T. (1976): Plant RNA-polymerases. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 119-132

ELLIS, R. J. (1975): Inhibition of chloroplast protein synthesis by Lincomycin and 2-(4- Methyl-2,6-dinitriloaniline)-N-Methylpropionamide. Phytochem. 1975/14, 89-93

FREY, H. D. (1964): Über die Abhängigkeit der Hitzeresistenz von der genetischen Konstituion einiger Raimannia-Oenotheren. Staatsexamensarbeit, Tübingen

FREY, H. D. (1967): Untersuchungen über die Hitzeresistenz und circadiane Rhythmik von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Dissertation, Tübingen

FREY, H. D. und SCHWEMMLE, B. (1967): Zur genetischen Analyse der circadianen Rhythmik bei höheren Pflanzen. Nachr. d. Akad. d. Wissenschaften, Göttingen, 10, 106-107

HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1972): Zur Beteiligung des Plasmons an der Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Z. Pflanzenphysiol. 68, 127-133

HACHTEL, W. (1977): Dependency of chloroplast membrane proteins on both nuclear and plastid DNA in some Oenothera species. Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 75-83

HAFF, L. A. and BOGORAD, L. (1976): Hybridization of maize chloroplast DNA with transfer RNAs. Biochemistry 15/18, 4105-4109

HAGEMANN, R. (1964): Plasmatische Vererbung. VEB Gustav Fischer, Jena

HALLICK, R. B., LIPPER, C., RICHARDS, O. C. and RUTTER, W. J. (1976): Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of Euglena gracilis. Biochemistry 15/14, 3039-3045

HALLICK, R. B.(1977): Cellular content of chloroplast DNA and chloroplast ribosomal genes in Euglena gracilis during chloroplast development. Biochemistry 16/4, 782-786

HAREL, E. and BOGORAD, L. (1973): Effect of light on RNA metabolism in greening maize leaves. Plant Physiol. 51, 10-16

HARTLEY, M. R. and ELLIS, R. J. (1973): Ribonucleic acid synthesis in chloroplasts. Biochem. J. 134, 249-262

HATRLEY, M. R. (1979): The synthesis and orogin of chloroplast low molecular weight rRNA in spinach. Eur. J. Biochem. 96, 311-320

HARTLEY, M. R. and HEAD, C. (1979): The synthesis of chloroplast high molecular weight rRNA in spinach. Eur. J. Biochem. 96, 301-309

HAUB, E. (1975): Untersuchungen zur CO_2-Fixierung bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Staatsexamensarbeit, Tübingen

HEIL, A. and ZILLIG, W. (1970): Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Lett. 11, 165-168

HERRMANN, R. G., BOHNERT, H. J., KOWALLIK, K. V. und SCHMITT, J. M. (1975): Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants. Biochim. Biophys. Acta 378, 305-317

HERRMANN, R. G., BOHNERT, H. J., DRIESEL, A., HOBOM, G. (1976): The location of rRNA genes on the restriction endonuclease map of the spinacia oleracea chloroplast DNA. In "Genetics and Biogenesis of chloroplasts and mitochondria" (Th. Bucher et al. eds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 351-359

HOOBER, J. K. and STEGEMAN, W. J. (1973): Control of synthesis of a major polypeptide of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardii. J. Cell Biol. 56, 1-12

HORGEN, P. A. and KEY, J. L. (1973): The DNA directed RNA-polymerases of soybean. Biochem. Biophys. Acta 294, 227-235

JENDRISAK, J. and GUILFOYLE, T. J. (1978): Eukaryotic RNA-polymerases: comparative subunit structures , immunologic properties and α-Amanitin sensivities of the class II enzymes from higher plants. Biochemistry 17/7, 1322-1328

JENDRISAK, J. J. (1979): Purification, structures and functions of RNA-polymerases from higher plants. Genome organization and expression in higher plants. Nato-, FEBS workshop, Edinburgh 11.-21. July

JOUSSAUME, M. (1973): Mise en evidence de deux formes de RNA-polymerase dependante du DNA dans les chloroplastes isoles des feuilles de pois. Physiol. veg. 11/1, 69-82

KIDD, G. H. and BOGORAD, L. (1979): Peptide maps comparing subunits of maize chloroplast and type II nuclear DNA-dependent RNA-polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76/10, 4890-2892

KIRK, J. T. O. (1964): DNA dependent RNA synthesis in chloroplast preparations. Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 393-397

KLEINSCHMIDT (1968): Monolayer techniques in electronmicroscopy of nucleic acid molcules. Meth. in Enymology 12/B, 361-377

KOLODNER, R. and TEWARI, K. K. (1975): The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. Biochim. Biophys. Acta 402, 372-390

KWANUYEN, P. and WILDMAN, S. G. (1978): Evidence that genetic information for chloroplast coupling factor I is shared by nuclear and chloroplast DNA. Biochim. Biophys. Acta 502, 269-275

LANGEWELLPOTT, D. (1970): Über den Einfluß von Geno- und Plasmotypus auf die phytochromgesteuerte Samenkeimung und die Chlorophyllsynthese " Staatsexamensarbeit, Tübingen

LINDELL, T. J., WEINBERG, F., MORRIS, P.W., ROEDER, R. G. and RUTTER, R. J. (1970): Specific inhibition of nuclear RNA-polymerase II by α- Amanitin. Science 170, 447-449

LUCK, D. J. L. and REICH, E. (1964): DNA in mitochondria of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 931-938

MULLINIX, K. P., STRAIN, G. C. and BOGORAD, L. (1973): RNA-polymerases of maize. Purification and molecular structure of DNA-dependent RNA-polymerase II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2386-2390

OHAD, J. and DREWS, G. (1974): Action spectrum for the synthesis of chlorophyll and chloroplast membrane proteins of cytoplasmic origin in Chlamydomonas reinhardii. In Proc. IIIrd Int. Congr. Photosythesis (M. Avron ed.) Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, 1907-1912

PFAU, B. (1979): Charakterisierung einer DNA-abhängigen RNS-Polymerase aus Oenotheren-Chloroplasten. Staatsexamensarbeit, Tübingen

POLYA, G. M. and JAGENDORF, A. T. (1971): Wheat leaf RNA-polymerases. I. Partial purification and characterization of nuclear, chloroplast and soluble DNA-dependent enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 146, 635-648

ROYER, H. D. and HOLLENBERG, C. P. (1977): Saccharomyces cerevisiae 2-µm-DNA. Mol. Gen. Genet. 150, 271-284

SAGER, R. and ISHIDA, M. R. (1963): Chloroplast DNA in Chlamydomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 725-730

SCHIEMANN, J. (1978): Untersuchungen über die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in Euglena gracilis. Dissertation, Halle

SCHIEMANN, J., WOLLGIEHN, R. and PARTHIER, B. (1977): Isolation of a transcription-active RNA-polymerase-DNA-complex from Euglena-chloroplasts. Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 474-478

SCHILDKRAUT, C. L., MARMUR, J. and DOTY, P. (1962): Determination of the base composition of DNA from its bouyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4, 430-443

SCHWEMMLE, B. (1962): Über den Einfluß von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Raimannia-Oenotheren. Planta 58, 619-646

SCHWEMMLE, J. HAUSTEIN, E. STURM, A. und BINDER, M. (1938): Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren. Z. Vererbungslehre 75, 358-800

SCHWEMMLE, J. und ZINTL, M. (1939): Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren. Die Analyse der Oenothera argentinea. Z. Vererbungslehre 76, 353-410

SCHWEMMLE, J. (1941): Weitere Untersuchungen an Eu-Oenotheren über die genetischen Bedingungen des Plasmas und der Plastiden. Z. indukt. Abstamm. Vererbungslehre 79, 321-335

SMITH, H. J. and BOGORAD, L. (1974): The polypeptide subunit structure of the DNA-dependent RNA-polymerase of Zea mays chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71/2, 4839-4842

SOUTHERN, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

SPENCER, D. and WHITFELD, P. R. (1967): Ribonucleic acid synthezising activity of spinach chloroplasts and nuclei. Arch. Biochem. Biophys. 121, 336-345

TIMOTHY, D. H., LEVINGS, C. S., PRING, D. R., CONDE, M. F. and KERMICLE, J. L. (1979): Organelle-DNA variation and systematic relationships in the genus Zea: Teosinte. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76/9, 4220-4224

WEINMANN, R. and ROEDER, R. G. (1974): Role of DNA-dependent RNA-polymerase III in the transcription of the tRNA and 5s RNA-genes. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 71, 1790-1794

WINTERSBERGER, E. (1973): Transcription in mitochondria. Mosbach Colloquium (E.F.K. Bautz, P. Karlson and H. Kersten eds.),Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York,24, 179-194

WOLLGIEHN, R. und MUNSCHE, D. (1972): RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten von Nicotiana rustica. Biochem. Physiol. Pflanzen 163, 137-155

WOLLGIEHN, R., LERBS, S. und MUNSCHE, D. (1978): Eigenschaften einer Chloroplasten-RNA vom Molekulargewicht $0{,}5 \times 10^6$ aus Nicotiana rustica. Biochem. Physiol Pflanzen 173, 60-69

LEBENSLAUF

Name:	Juliane Kunigunde Alt
Geburtsort und -datum:	Laupheim/ Württ., 16. 9. 1951
Eltern:	Dr. Richard Michael Alt Dr. Erna Margit Alt, geb. Weber
Reifeprüfung:	Juni 1970, Gymnasium Laupheim
Hochschulstudium:	1970-1976 Biologie, Universität Tübingen
Akademische Prüfungen:	1973: Vordiplom 1976: Diplom
Dissertation:	1977-1980 am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. B. Schwemmle
Akademische Lehrer:	F.W. Bentrup, E. Bünning, K.G. Grell, J. Guglielmi, A. Hager, E. Lindner, K. Mägdefrau, H. Metzner, F.P. Möhres, D. Oelkrug, W. Rüdorff, W. Rundel, E.M. Sander, V. Schwartz, B. Schwemmle, W. Seyffert, D. Sperlich, G. Weitzel, K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche.